

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Ingegneria Chimica, dell'Ambiente e della Sicurezza

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di appartenenza: 09/D2

Settore Scientifico disciplinare: ING-IND/24

**PURIFICAZIONE DI PLASMINOGENO CON MEMBRANE DI
AFFINITÀ**

Presentata da: Dott.ssa Claudia Castro

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Ing. S. Bandini

Relatore

Prof. Ing G. C. Sarti

Correlatore

Dott.ssa Ing. C. Boi

Esame finale anno 2014

INDICE

INTRODUZIONE	1
---------------------------	----------

CAPITOLO 1

IL CONTESTO SCIENTIFICO	4
--------------------------------------	----------

1.1	La vitreolisi enzimatica	4
1.2	Separazione e purificazione di proteine mediante cromatografia convenzionale	9
1.2.1	<i>Cromatografia a scambio ionico</i>	10
1.2.2	<i>Cromatografia ad esclusione di forma</i>	11
1.2.3	<i>Cromatografia per interazione idrofobica</i>	12
1.2.4	<i>Cromatografia a fase inversa</i>	14
1.2.5	<i>Cromatografia di affinità</i>	15
1.3	Il plasminogeno e la plasmina	16
1.4	Purificazione del plasminogeno	17

CAPITOLO 2

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ CON MEMBRANE	20
---	-----------

2.1	Il ligando e il supporto cromatografico	20
-----	---	----

2.2	Fasi della cromatografia di affinità	22
2.3	Tipi di trasporto in cromatografia di affinità	24
2.4	Le membrane come supporto di affinità	27
2.5	Membrane in cellulosa e cellulosa rigenerata	28

CAPITOLO 3

STRUMENTI E TECNICHE SPERIMENTALI	31
---	----

3.1	Agitatore termostatico	31
3.2	Spettrofotometro e misure spettrofotometriche	33
3.2.1	<i>Saggio colorimetrico per la valutazione della quantità di ligando immobilizzato Sistema</i>	35
3.3.	FPLC	38
3.3.1	<i>Software di gestione Unicorn™</i>	41
3.4	Sistema HPLC	41
3.4.1	<i>Analisi SEC</i>	44
3.5	Elettroforesi	45
3.5.1	<i>SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis)</i>	46
3.6	Reagenti e soluzioni	50

CAPITOLO 4

Preparazione e caratterizzazione delle membrane di affinità: PROTOCOLLO I	51
--	----

4.1	Il supporto: Membrane Sartobind Epoxy® Sartorius	51
4.2	Il ligando: L-lisina	53
4.3	Reazione di immobilizzazione del ligando sulle membrane	54
4.4	Protocollo I	55
4.4.1	<i>Studio dell'efficienza dell'immobilizzazione</i>	56
4.5	Caratterizzazione dinamica delle membrane con siero umano	59
4.5.1	<i>Condizioni operative</i>	60
4.6	Risultati della caratterizzazione dinamica	62
4.7	Criticità del Protocollo I	66

CAPITOLO 5

Preparazione e caratterizzazione delle membrane di affinità: PROTOCOLLO II	67
---	----

5.1	Protocollo II	67
5.1.1	<i>Studio dell'efficienza dell'immobilizzazione</i>	69
5.2	Caratterizzazione dinamica delle membrane con siero bovino	72
5.2.1	<i>Prove A</i>	73
5.2.2	<i>Prove B</i>	74
5.2.3	<i>Risultati della caratterizzazione dinamica</i>	76
5.3	Validità del Protocollo II	77
5.4	Caratterizzazione dinamica con siero umano	78
5.4.1	<i>Risultati della caratterizzazione dinamica</i>	80
5.5	Studio degli effetti dei parametri operativi	85
5.5.1	<i>Variazione del numero di membrane</i>	85
5.5.2	<i>Effetti della diluizione del siero</i>	86

5.5.3	<i>Ciclo cromatografico con doppio adsorbimento</i>	88
5.6	Studio della stabilità del legame: due cicli cromatografici successivi.....	89
5.7	Studio della densità di ligando in funzione della temperatura	91
5.8	Utilizzo di L-lisina-HCl come ligando alternativo	93

CAPITOLO 6

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ CON RESINA	96
--	----

6.1	Impaccamento colonna	97
6.2	Purificazione di plasminogeno con colonna cromatografica	99
6.3	Risultati	103

CAPITOLO 7

CONFRONTO FRA PROCESSI CROMATOGRAFICI	107
---	-----

7.1	Analisi e confronto dei risultati	107
7.2	Cromatografia di affinità combinata	118
7.2.1	<i>Rimozione della BSA</i>	119
7.2.2	<i>Separazione del plasminogeno</i>	120
7.3	Confronti quantitativi fra supporti	125
7.3.1	<i>Valutazione della produttività</i>	125
7.3.2	<i>Valutazione dei costi</i>	127

CONCLUSIONI	129
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	132
---------------------------	------------

APPENDICE	140
------------------------	------------

A.1 Composizione delle soluzioni utilizzate nelle prove	140
---	-----

A.2 Retta di calibrazione dello spettrofotometro con acido arancio 7	145
--	-----

A.3 Modulo a membrane.....	147
----------------------------	-----

RINGRAZIAMENTI	149
-----------------------------	------------

INTRODUZIONE

Il progetto di ricerca sviluppato nel corso del Dottorato e raccolto nella presente tesi, nasce dalla necessità di rispondere, attraverso strumenti specifici dell'ingegneria chimica, a precise esigenze avanzate dalla medicina ed in particolare dal settore oftalmologico.

Infatti, alcune serie patologie dell'occhio, come le miodesopsie, attualmente possono essere curate ricorrendo ad un intervento di vitrectomia. Nonostante la vitrectomia chirurgica abbia raggiunto elevati livelli di precisione, ad essa spesso sono associati gravi rischi, che potrebbero essere evitati ricorrendo alla vitrectomia enzimatica; questa tecnica permette la rimozione del vitreo attraverso l'azione di enzimi che idrolizzano i costituenti dell'interfaccia fra vitreo e retina. Uno degli enzimi adatti a questo scopo è la plasmina, che si ricava dall'attivazione del plasminogeno umano per mezzo di specifici attivatori; e particolarmente adatta a questo tipo di applicazione è la plasmina autologa, che eviterebbe problemi di compatibilità e di rigetto (Capitolo 1).

Alla luce di queste considerazioni è evidente l'importanza che assume la purificazione del plasminogeno presente nel sangue.

In generale una delle migliori tecniche per separare/purificare biomolecole presenti in basse concentrazioni in fluidi complessi di provenienza biologica, è la cromatografia di affinità. Essa si distingue, rispetto ad altri processi di separazione, come filtrazione, centrifugazione, estrazione liquido-liquido, per

l'elevata specificità che garantisce un processo efficiente, che permette di conservare pienamente le proprietà biologiche delle molecole.

Il meccanismo di separazione è realizzato dall'interazione specifica e reversibile che si stabilisce tra una molecola, come una proteina o un enzima, ed una sostanza complementare chiamata ligando, immobilizzata su un supporto insolubile.

La cromatografia di affinità, quindi, permette di ottenere elevati gradi di purezza in un singolo stadio.

Benché la tecnica più diffusa per purificazione del plasminogeno sia la cromatografia di affinità con resina, in questo lavoro si vuole isolare il plasminogeno con cromatografia di affinità a membrane, al fine di sfruttare i vantaggi ad esse associati.

Infatti, i supporti in resina sono costituiti da granuli porosi (beads) attraverso cui il trasporto di materia è governato dalla diffusione, che richiede tempi lunghi perché la proteina possa raggiungere il ligando; al contrario utilizzando membrane microporose come supporto cromatografico il trasporto di materia è prevalentemente convettivo, in quanto la macromolecola si trova subito in contatto con il ligando, con conseguente riduzione dei tempi richiesti per la separazione (Capitolo 2).

Pertanto, l'utilizzo di membrane di affinità come supporto cromatografico nell'applicazione prevista in questo lavoro di tesi, permetterebbe la realizzazione di un processo rapido ed economico, immediatamente prima dell'intervento chirurgico utilizzando un dispositivo monouso.

Per raggiungere l'obiettivo prefissato è stato necessario rivolgere particolare attenzione alla scelta delle membrane da utilizzare per la cromatografia di affinità e al processo di modifica a cui sottoporre le membrane stesse affinché risultassero adeguate per l'applicazione prevista.

Dopo aver individuato le membrane in cellulosa rigenerata ad attivazione epossidica adatte all'immobilizzazione della L-lisina, ligando specifico per il plasminogeno, sono stati sperimentati ed ottimizzati due diversi protocolli di modifica (Capitolo 4 e Capitolo 5).

L'efficienza dell'immobilizzazione è stata definita determinando la quantità di ligando immobilizzato, mediante un saggio colorimetrico che utilizza acido arancio 7 come indicatore (Capitolo 3).

Le membrane modificate che hanno presentato la migliore resa di immobilizzazione sono state caratterizzate in condizioni dinamiche con siero bovino e siero umano (Capitolo 4 e Capitolo 5).

Inoltre, è stata rivolta l'attenzione allo studio dell'influenza di alcuni parametri operativi sul comportamento delle membrane durante il processo cromatografico.

Processi cromatografici per la separazione del plasminogeno, in condizioni analoghe a quelle applicate alle membrane modificate, sono stati realizzati anche con una resina di affinità commercialmente disponibile (Capitolo 6), al fine di confrontare le prestazioni dei due supporti (Capitolo 7).

Si precisa che l'avvenuta separazione della proteina di interesse è stata valutata attraverso le tecniche analitiche descritte nel Capitolo 3 e che le composizioni delle soluzioni utilizzate, le rette di taratura e la descrizione del modulo a membrane utilizzato si trovano nell'Appendice riportata al termine della tesi.

CAPITOLO 1

IL CONTESTO SCIENTIFICO

L'attività di ricerca descritta nella presente tesi si colloca all'interno di un contesto scientifico che si caratterizza per l'applicazione di processi tipici dell'ingegneria chimica, quali i processi di separazione, per rispondere a precise esigenze manifestate in campo biomedico.

1.1 La vitreolisi enzimatica

L'occhio umano (Figura 1.1) è occupato per circa l'80% dal vitreo composto principalmente da acqua, fibre di collagene e acido ialuronico [1].

In condizioni normali le fibre di collagene, che formano la corteccia vitreale, sono saldamente attaccate alla parte centrale della retina, chiamata macula, e

connessi alla membrana limitante interna attraverso un collante biochimico composto principalmente da laminina e fibronectina [2].

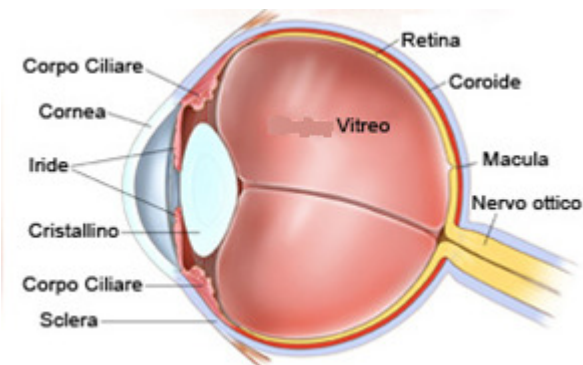


Figura 1.1 Struttura dell'occhio.

Il vitreo aderisce in modo anormale alla macula quando in alcune regioni l'adesione aumenta in risposta a forze di tipo antero-posteriore e/o di tipo tangenziale generando una trazione vitreoretinale che diventa un problema sintomatico [3].

In genere i sintomi coinvolgono la riduzione della capacità visiva e difetti del campo visivo.

La trazione a livello dell'interfaccia tra vitreo e retina ricopre un ruolo importante nella patogenesi di varie malattie retiniche, infatti, oltre ad incrementare la degenerazione maculare associata all'età, essa influisce sulla progressione della retinopatia diabetica proliferante, sull'edema maculare diabetico trazionale, sulla formazione del pucker maculare e delle miodesopsie [3-5].

L'unico trattamento dei disturbi dell'interfaccia tra vitreo e retina consiste nella vitrectomia [4, 5].

Nonostante la vitrectomia chirurgica abbia raggiunto elevati livelli di precisione, i limiti associati alla separazione meccanica del vitreo dalla retina non sono

completamente superati. Infatti all'intervento di vitrectomia potrebbero seguire solo una parziale rimozione del vitreo, un possibile trauma retinico o addirittura infezioni e sanguinamenti [4, 6].

Al fine di ridurre i rischi appena descritti, negli ultimi anni ha suscitato particolare interesse la manipolazione enzimatica del vitreo ovvero la vitrectomia enzimatica chiamata anche vitreolisi farmacologica [4-8].

Questa tecnica permette la rimozione del vitreo e la completa separazione dell'interfaccia vitreo retinica attraverso l'iniezione di enzimi capaci di idrolizzare i costituenti dell'interfaccia stessa.

La scelta dell'enzima da utilizzare non è semplice, in quanto deve tener conto della complessa struttura del vitreo. Qualunque tentativo di alterare la struttura molecolare del vitreo deve ottenere simultaneamente due effetti: la liquefazione del gel vitreale e l'interruzione dei legami tra vitreo e retina; in particolare se il secondo effetto non fosse pienamente raggiunto si rischierebbe nel paziente una elevata miopia, o patologie come il foro maculare.

Sostanze come la condroitinase, la dispase e la ialuronidasi che agiscono sui componenti biochimici dell'interfaccia vitreoretinale, sono state sperimentate e abbandonate a causa di insufficiente efficacia chimica e/o complicazioni [9-11].

Invece la plasmina e la microplasmina hanno mostrato efficacia in studi in vivo di vitreolisi su animali e umani.

La plasmina, enzima chiave del sistema fibrinolitico, possiede la capacità di idrolizzare molte glicoproteine tra cui la laminina e la fibronectina, che ricoprono un ruolo fondamentale nell'adesione tra vitreo e membrana limitante interna.

La plasmina può essere ricavata dal siero del paziente stesso (plasmina autologa) evitando problemi di rigetto, inoltre la sua attività decresce di un valore irrilevante entro le 24 ore [4, 5, 7, 8].

I primi lavori sull'applicazione della plasmina finalizzata al distacco posteriore del vitreo sono stati condotti sugli occhi dei conigli [12].

Attraverso questi studi è stato verificato che l'iniezione intravitreo della plasmina seguita da una vitrectomia induce con successo il distacco posteriore del vitreo, come confermato da analisi istologiche [13].

Gli studi condotti da Kim *et al.* hanno evidenziato che la plasmina da sola è sufficiente a produrre una separazione netta tra vitreo e retina [14].

Sperimentazioni effettuate su occhi di maiali e di cadaveri umani hanno provato che il grado di separazione vitreoretinale indotta dalla plasmina dipende dalla concentrazione e dalla durata dell'esposizione all'enzima senza che si manifesti alcun danno retinico [15,16]. Infatti usando la microscopia elettronica è stato osservato che le fibre di collagene del vitreo presenti sulla superficie retinale si riducono progressivamente aumentando le dosi di plasmina somministrata, senza produrre cambiamenti morfologici alla retina interna [17].

Inoltre, attraverso tecniche di etichettatura immunocitochimica è stato dimostrato che il trattamento con plasmina diminuisce drasticamente la densità di laminina e fibronectina sulla membrana limitante interna [17].

Nel corso degli ultimi anni sono stati realizzati numerosi studi sugli effetti della plasmina autologa somministrata a pazienti con varie patologie oftalmologiche di origine vitreale.

Trese *et al.* hanno studiato gli effetti della vitrectomia assistita con plasmina nella cura dei fori maculari e della retinopatia prematura, raccogliendo risultati positivi in tutti i pazienti [18,19].

L'uso della vitrectomia assistita con plasmina nel trattamento dei buchi maculari ha rivelato alti livelli di distacco posteriore spontaneo del vitreo consentendo una notevole riduzione dei tempi necessari per l'intervento [7, 20-22].

Anche altri studi che si sono occupati dell'impiego della plasmina preoperatoria in casi di edema maculare diabetico trazionale hanno mostrato che nel momento dell'intervento chirurgico si ottiene un distacco posteriore del vitreo

superiore a quello ottenuto con la chirurgia convenzionale, a cui è associata un'ottima qualità della vista postoperatoria [5, 23].

L'alternativa alla plasmina nella vitreolisi enzimatica è costituita dalla microplasmina, chiamata anche ocriplasmina [3, 12].

La microplasmina è una forma troncata di plasmina (Figura 1.2), che presenta attività proteolitica nei confronti della fibronectina e della laminina in modo analogo alla plasmina [24-26].

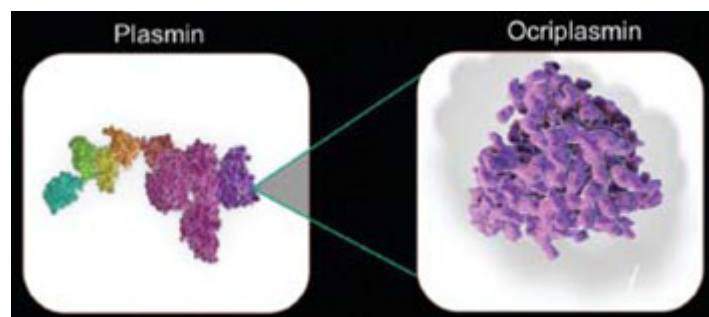


Figura 1.2 Plasmina e microplasmina.

Il peso molecolare della microplasmina è di 22 kDa e rappresenta $\frac{1}{4}$ di quello della plasmina (88 kDa), per questo motivo la microplasmina riesce a penetrare nel vitreo in modo agevole [12]. D'altra parte a causa del suo basso peso molecolare è stato osservato, attraverso sperimentazioni sui ratti, che la microplasmina degrada la laminina e la fibronectina presenti non solo sulla superficie vitreoretinale ma anche a livello dello strato dei fotorecettori nella retina esterna producendo dei possibili disagi [27].

La microplasmina è ottenuta attraverso tecniche di DNA ricombinante, che da un lato assicurano la sterilità del prodotto eliminando il rischio di contaminazione microbica associata ai derivati del sangue [12], ma dall'altro

necessitano di precise competenze e di specifiche attrezzature che influenzano notevolmente i costi di produzione rispetto alla produzione della plasmina.

Alla luce delle informazioni raccolte si può affermare che a parità di efficacia, l'utilizzo di plasmina durante la vitreolisi sia più conveniente rispetto all'utilizzo della microplasmina.

1.2 Separazione e purificazione di proteine mediante cromatografia convenzionale

Per studiare e raccogliere informazioni sulla struttura e la funzione di una proteina e soprattutto per poter utilizzare una specifica proteina in applicazioni biomediche, come nel nostro caso, bisogna isolarla dalle altre proteine.

La cromatografia è il metodo più adatto e più diffuso per separare le proteine, grazie alla sua versatilità, alta selettività ed efficienza [28, 29]. Tale processo si realizza sfruttando particolari proprietà delle proteine quali la carica, il carattere idrofilo o idrofobico, le dimensioni e l'affinità di legame (Tabella 1.1) [30].

Tabella 1.1 Tecniche di separazione delle proteine.

Proprietà	Tecnica
Carica	Cromatografia a scambio ionico
Dimensione	Cromatografia ad esclusione di forma (SEC) o gel filtrazione
Idrofobicità	Cromatografia per interazione idrofobica Cromatografia a fase inversa
Proprietà di legame	Cromatografia di affinità

In generale, durante un processo cromatografico una soluzione contenente una miscela di composti da purificare viene alimentata in una colonna riempita con un materiale solido e poroso, chiamato matrice o supporto cromatografico, dotato di specifiche proprietà chimiche che rappresenta la fase stazionaria. Lasciando da parte la cromatografia ad esclusione di forma, in tutti i più comuni processi industriali i soluti vengono adsorbiti dal materiale di riempimento finché non viene saturata la capacità del letto. Quindi, dopo un lavaggio per rimuovere le impurezze, viene alimentata una soluzione che permette di scindere il legame tra le proteine e il supporto solido in modo da permettere il recupero della proteina stessa.

1.2.1 Cromatografia a scambio ionico

La cromatografia a scambio ionico sfrutta le differenze di intensità della carica elettrica netta delle proteine ad un determinato valore di pH.

La matrice della colonna è costituita da una resina contenente gruppi carichi (Figura 1.3). Le resine caratterizzate da gruppi carichi negativamente sono dette scambiatori di cationi mentre quelle con gruppi carichi positivamente scambiatori di anioni.

Poiché l'interazione di ciascuna proteina con i gruppi carichi della matrice dipende dal pH e dalla concentrazione di sali nella soluzione tampone, la separazione può essere ottimizzata variando gradualmente il pH e/o la concentrazione salina in soluzione.

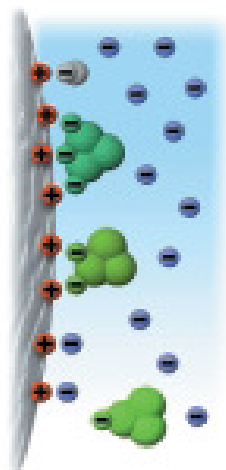


Figura 1.3 Schema della cromatografia a scambio ionico.

Per esempio, nella cromatografia con la matrice solida avente gruppi carichi positivamente, le proteine nella fase mobile che possiedono una carica netta negativa migrano attraverso la resina più lentamente delle proteine con carica netta positiva, poiché la migrazione delle prime viene ritardata dall'interazione con la resina, venendo in questo modo adsorbite dal supporto.

La diffusione della soluzione proteica nella fase mobile è dovuta sia alla separazione delle proteine, che hanno proprietà diverse, sia dalla semplice diffusione della soluzione.

Se si aumenta la lunghezza della colonna, in genere si migliora la separazione di due proteine con cariche diverse.

1.2.2 Cromatografia ad esclusione di forma

La cromatografia ad esclusione di forma o SEC (Size Exclusion Chromatography), chiamata anche gel filtrazione, separa le proteine in base

alle loro dimensioni [31, 32]: le proteine più grandi attraversano la colonna prima di quelle più piccole.

La fase solida è costituita da granuli porosi che presentano pori con distribuzione di dimensioni controllate. Le proteine di grandi dimensioni non riuscendo ad entrare nei pori attraversano la colonna rapidamente percorrendo un cammino più breve. Invece, le proteine più piccole penetrando nei pori seguono dei percorsi più lunghi e, di conseguenza, impiegano più tempo ad attraversare la colonna (Figura 1.4).



Figura 1.4 Schema della cromatografia ad esclusione di forma.

1.2.3 Cromatografia per interazione idrofobica

La cromatografia per interazione idrofobica è una tecnica di purificazione che isola le proteine in base alla propria idrofobicità superficiale, utilizzando una interazione reversibile tra le proteine e la superficie idrofobica della matrice.

Una proteina in soluzione acquosa presenta residui amminoacidi idrofobici esposti sulla superficie che possono interagire con i gruppi idrofobici distribuiti nella fase stazionaria (Figura 1.5).

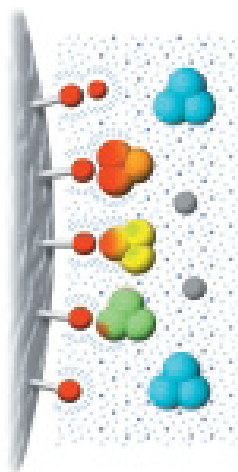


Figura 1.5 Schema della cromatografia per interazione idrofobica.

La presenza di sali in soluzione aumenta l'interazione idrofobica favorendo il legame con la matrice. L'eluizione viene realizzata abbassando gradualmente la concentrazione del sale: diminuendo la concentrazione di sale le proteine con più bassa idrofobicità vengono eluite. Di conseguenza le proteine ad alta idrofobicità vengono eluite per ultime.

Con questa tecnica le colonne permettono sia di purificare sia di rimuovere sali dai campioni.

Per la natura delle interazioni idrofobiche e ioniche, la cromatografia ad interazione idrofobica e quella a scambio ionico possono essere usate in modo sequenziale. Infatti dopo uno scambio ionico, la proteina si trova in condizioni di alta concentrazione salina, quindi può essere sottoposta a cromatografia per interazione idrofobica per uno stadio di purificazione successivo.

Viceversa, una proteina su colonna idrofobica viene eluita a bassa concentrazione salina, condizione che permette alle proteine di legarsi su una resina a scambio ionico.

1.2.4 Cromatografia a fase inversa

Dal punto di vista teorico la cromatografia a fase inversa è analoga a quella idrofobica poiché entrambe si basano su interazioni idrofobiche tra le zone idrofobiche distribuite sulla superficie delle biomolecole e la superficie idrofobica distribuita nella fase stazionaria (Figura 1.6).

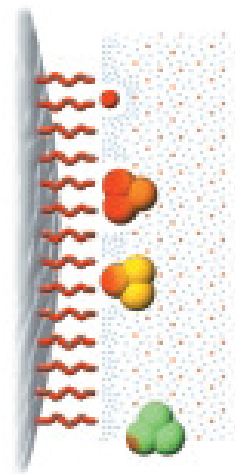


Figura 1.6 Schema della cromatografia a fase inversa.

In pratica le due tecniche sono diverse, infatti la matrice utilizzata per la cromatografia a fase inversa è solitamente più idrofobica di quella usata nella cromatografia per interazione idrofobica, di conseguenza si presentano

interazioni molto intense, che devono essere invertite durante l'eluizione usando solventi non polari, organici come acetonitrile o metanolo. Le proteine in questi solventi vengono solitamente denaturate, di conseguenza è necessario rinaturarle per ottenerne nuovamente la funzionalità.

1.2.5 Cromatografia di affinità

La cromatografia di affinità separa le proteine in base all'interazione reversibile che si stabilisce tra la proteina di interesse e uno specifico ligando immobilizzato sulla matrice.

Quando la colonna è attraversata da una miscela di proteine ogni specie proteica che presenti affinità con il ligando si lega ad esso (Figura 1.7). Dopo aver lavato via dalla colonna le proteine che non si legano, la proteina rimasta legata al ligando immobilizzato può essere eluita con un tampone specifico capace di competere con il ligando indebolendo il legame stesso e staccando la proteina dalla matrice.



Figura 1.7 Schema della cromatografia di affinità.

1.3 Il plasminogeno e la plasmina

Il plasminogeno è il precursore inattivo, presente nel plasma, dell'enzima proteolitico plasmina, che occupa un importante ruolo nel sistema fibrinolitico [33, 34]. Inoltre, questo enzima, catalizzando la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico, degrada oltre alla fibrina anche molte proteine presenti nel plasma e in ambiente extracellulare.

Il livello di plasminogeno nel plasma umano o analogamente nel siero, che corrisponde al plasma privato del fibrinogeno, è di circa 200 mg/L e il suo peso molecolare risulta essere circa 92 kDa.

Il plasminogeno è una glicoproteina a singola catena, contenente 791 residui di amminoacidi. La molecola del plasminogeno può essere divisa in sei domini strutturali principali, ognuno caratterizzato da specifiche proprietà.

In particolare, si individuano cinque domini, denominati kringle (K), organizzati in una struttura a loop a tre ponti disolfuro. Insieme al peptide preattivazione (PAP), i kringle controllano la capacità del plasminogeno di assumere diverse conformazioni. A questi domini si aggiunge il dominio proteasico (P) che contiene i siti attivi essenziali per la naturale funzione del plasminogeno (Figura 1.8) [34].

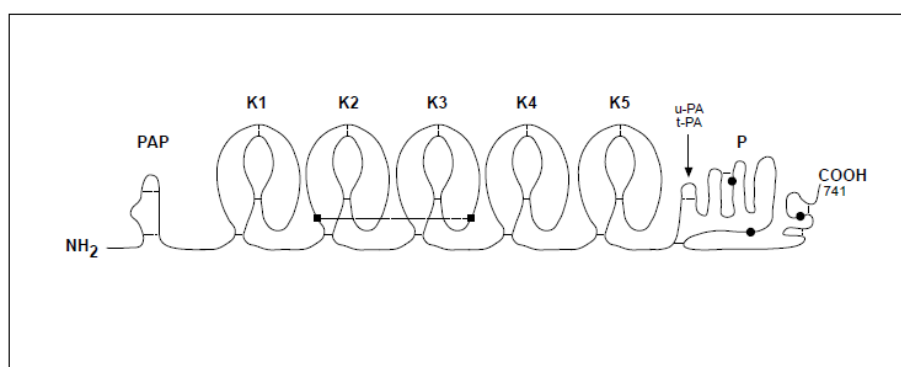


Figura 1.8 Struttura della molecola del plasminogeno.

Il plasminogeno è convertito in plasmina sotto l'azione di diversi attivatori che si distinguono in attivatori endogeni ed esogeni.

Gli attivatori endogeni, quali l'attivatore tissutale (t-PA) e l'urochinasi (u-PA) si trovano nel sangue mentre la streptochinasi (SK), attivatore esogeno, è prodotta da batteri streptococchi.

I due tipi di attivatori agiscono sul plasminogeno con due diversi meccanismi; infatti l'attivazione del plasminogeno mediante il coinvolgimento degli attivatori endogeni è il risultato della rottura di un legame in una precisa posizione della struttura del plasminogeno, che dà luogo ad una nuova molecola formata da due catene legate attraverso due ponti disolfuro e che costituisce la proteasi plasmina. Invece la streptochinasi agendo su uno specifico legame del plasminogeno lo converte in una nuova molecola che diventa capace di attivare a plasmina le molecole di plasminogeno presenti. Più precisamente, la streptochinasi tende a formare un complesso stechiometrico 1:1 con il plasminogeno: ed è questo nuovo complesso a comportarsi da attivatore delle altre molecole di plasminogeno [33, 34].

1.4 Purificazione del plasminogeno

La purificazione del plasminogeno a partire da plasma o da siero umano ha suscitato particolare interesse a partire dalla prima metà del 1900, ovvero da quando sono state scoperte le proprietà antitrombotiche della plasmina. I primi tentativi di isolare il plasminogeno furono realizzati sfruttando i principi della cromatografia a scambio ionico su colonne di carbossimetilcellulosa [35]. Altri esperimenti furono condotti utilizzando colonne per la gel filtrazione [36].

Entrambi i metodi hanno una resa relativamente bassa, infatti da una parte portano ad un grado di purificazione accettabile, dall'altra consentono un recupero modesto della quantità di plasminogeno presente nella soluzione di partenza [35, 36].

Per questo motivo, negli anni successivi si è preferito ricercare ed ottimizzare un metodo più sistematico, che permettesse una separazione della molecola basata su interazioni di tipo specifico. Tra tutti i processi di purificazione, come visto in precedenza, l'unico metodo in grado di separare le biomolecole in base alle proprietà di legame che le caratterizzano è cromatografia di affinità.

La cromatografia di affinità risulta particolarmente adatta alla purificazione del plasminogeno da siero poiché, grazie all'interazione specifica che si stabilisce tra la proteina e il suo ligando, consente di raggiungere elevati livelli di purezza anche nella separazione di proteine presenti in basse concentrazioni in fluidi biologici complessi.

Il metodo usuale per realizzare un processo cromatografico di affinità per la purificazione del plasminogeno, utilizza colonne impaccate con resine commerciali a base di agarosio su cui si trova immobilizzato il ligando specifico per il plasminogeno: la L-lisina [33, 37-39]. Tra le resine commerciali maggiormente diffuse per questa applicazione si ricorda in particolare la resina Lysine Sepharose™ 4B prodotta dalla GE Life Science e la resina Lysine HyperD® prodotta dalla Pall.

Invece per il tipo di applicazione previsto in questa attività di ricerca, si è mirato a purificare il plasminogeno da siero attraverso cromatografia di affinità con membrane, al fine di sfruttare i vantaggi derivanti dall'utilizzo di tale supporto rispetto alla resina. Infatti, come si evidenzierà nel prossimo capitolo, la maggiore rapidità del processo a membrana renderebbe la purificazione realizzabile immediatamente prima dell'intervento chirurgico con minore probabilità di denaturazione della biomolecola. Inoltre si potrebbe progettare un

filtro monouso, ideale per la separazione di proteine autologhe e per il mantenimento delle condizioni sterilità necessarie.

CAPITOLO 2

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ CON MEMBRANE

In questo capitolo vengono descritte le peculiarità della cromatografia di affinità e le caratteristiche che distinguono i vari supporti cromatografici, rivolgendo particolare attenzione ai vantaggi associati all'utilizzo delle membrane di affinità.

2.1 Il ligando e il supporto cromatografico

La cromatografia di affinità risulta particolarmente adatta per la purificazione delle biomolecole perché consente di raggiungere elevati livelli di purezza grazie all'interazione specifica e reversibile che avviene tra il ligando, immobilizzato sulla matrice, e la biomolecola da purificare.

L'interazione che si realizza tra uno specifico ligando e la biomolecola di interesse per la sua natura reversibile è un legame di tipo debole, pertanto può

essere il risultato di interazioni elettrostatiche o idrofobiche, di forze di Van der Waals e/o legame idrogeno.

In un unico stadio la cromatografia di affinità è in grado di offrire un grande risparmio di tempo rispetto ad altri processi, permettendo anche la purificazione di biomolecole presenti in basse concentrazioni in fluidi complessi di provenienza biologica, come plasma o siero.

Nel caso in cui si voglia raggiungere un livello di purezza superiore o nel caso in cui non si trovi un ligando adatto alla purificazione di una particolare biomolecola, è possibile sviluppare un processo multistadio.

Condizioni necessarie per la realizzazione di una cromatografia di affinità di successo sono l'individuazione di un ligando specifico per la biomolecola da isolare, l'individuazione del supporto cromatografico, quindi l'immobilizzazione del ligando sulla matrice ritenuta più adatta.

Il ligando affine alla proteina bersaglio, chiamata legante, viene immobilizzato chimicamente, di solito covalentemente, sul supporto in modo da conservare la sua specifica capacità di legame nei confronti della biomolecola di interesse e garantire la formazione del complesso legante-ligando durante il processo cromatografico. Il legame tra ligando e legante deve risultare reversibile, affinché, dopo il lavaggio delle molecole non legate, la proteina bersaglio possa essere recuperata in forma attiva.

Si ricorda che la selettività è garantita dal riconoscimento specifico della struttura proteica di interesse dal ligando e non dipende da proprietà chimiche o dimensioni fisiche che potrebbero essere comuni a più proteine.

I materiali usati come ligandi possono essere naturali come amminoacidi, proteina A e G, lectine, coenzimi, enzimi e anticorpi o artificiali, come coloranti e metalli chelati.

Mentre la scelta del ligando è strettamente legata alla biomolecola da separare, la scelta del supporto si basa su specifici requisiti che da una parte devono

permettere l'immobilizzazione del ligando e dall'altra devono consentire la realizzazione del processo cromatografico [40, 41].

Caratteristica fondamentale per il supporto è che sia un solido poroso con un'elevata superficie per unità di volume che sia facilmente funzionalizzabile per l'attacco del ligando scelto. In questo modo vengono favorite le interazioni fra ligando e proteina, garantendo una buona capacità di adsorbimento.

Le dimensioni dei pori devono essere tali da permettere il passaggio delle macromolecole presenti in soluzione evitando un'azione filtrante.

Inoltre i supporti devono offrire una resistenza meccanica capace di sopportare le differenze di pressione a cui vengono sottoposti durante l'utilizzo.

Ovviamente essi devono risultare chimicamente stabili e quindi resistenti all'azione dei solventi utilizzati durante le fasi di attivazione e indifferenti ai cambiamenti di forza ionica e pH.

I supporti devono interagire il meno possibile con la soluzione con cui vengono a contatto al fine di ridurre l'adsorbimento aspecifico di proteine che contaminerebbero il prodotto finale.

A tutto ciò va aggiunto che il materiale deve risultare poco costoso, facilmente reperibile, capace di mantenere i siti attivi nel tempo.

2.2 Fasi della cromatografia di affinità

Dopo una fase preliminare di equilibratura in cui viene fatta fluire in colonna una soluzione tampone, generalmente la stessa che poi si utilizzerà nella fase di lavaggio, per rimuovere le soluzioni di stoccaggio della fase stazionaria o eventuali impurezze, si procede con le tre fasi principali delle separazioni di affinità: l'adsorbimento, il lavaggio ed infine l'eluizione (Figura 2.1).

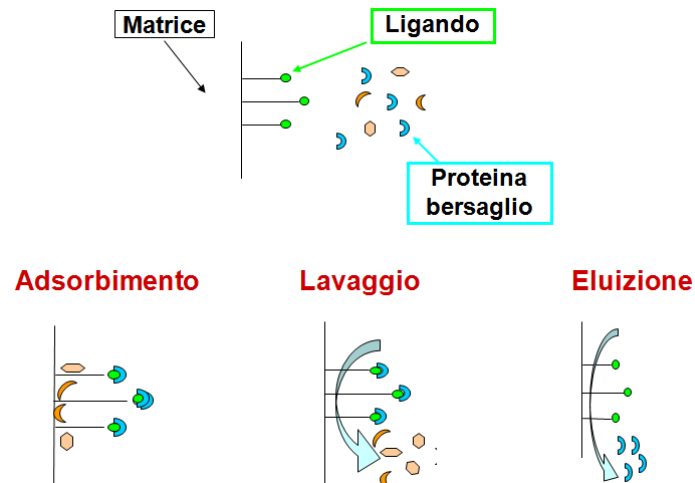


Figura 2.1 Schema delle fasi di separazione in cromatografia di affinità.

- **Adsorbimento.** Il campione da purificare viene messo a contatto con la matrice solida provvista di specifico ligando, su cui viene adsorbita la proteina di interesse.
- **Lavaggio.** Quindi si procede al lavaggio del supporto, con l'intento di eliminare le molecole rimaste intrappolate nel supporto o legate ad esso attraverso interazioni non specifiche.
- **Eluizione.** Durante la fase di eluizione viene rotto il legame specifico tra legante e ligando permettendo il recupero della proteina di interesse.

L'eluizione può essere di tipo specifico o non specifico: l'eluizione specifica si realizza utilizzando una soluzione (eluente) contenente un composto che compete con il ligando; l'eluizione non specifica avviene cambiando le condizioni operative come pH, forza ionica o polarità.

In generale le tre fasi principali del processo cromatografico possono essere seguite da una fase di rigenerazione del supporto, utile a riportare il supporto nelle condizioni necessarie per un utilizzo successivo in applicazioni di

processo. Un profilo qualitativo di un intero ciclo cromatografico è presentato in Figura 2.2.

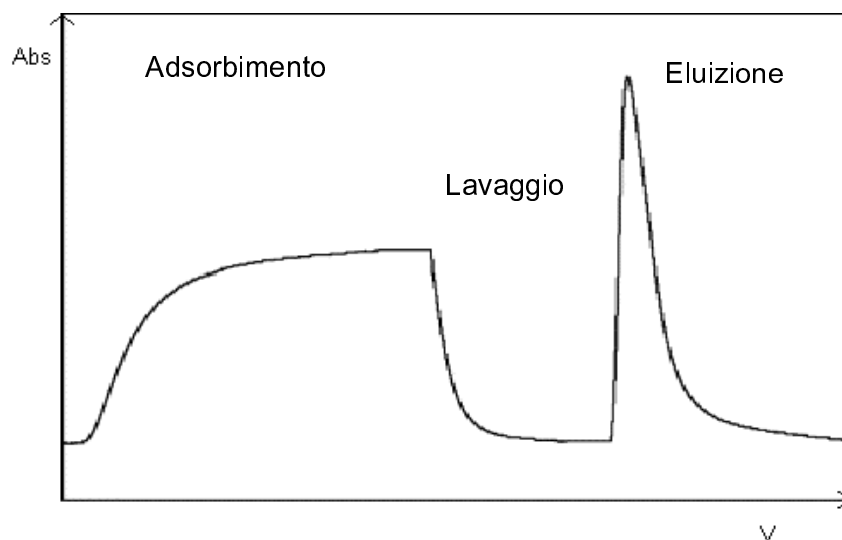


Figura 2.2 Profilo qualitativo di un ciclo completo di cromatografia di affinità.

2.3 Tipi di trasporto in cromatografia di affinità

Il risultato di una separazione attraverso cromatografia di affinità è influenzato da fattori sia cinetici che termodinamici; questi ultimi caratterizzano il comportamento del sistema quando si trova all'equilibrio. I fattori cinetici giocano invece un ruolo importante nel determinare l'efficienza del processo reale, poiché comprendono le cinetiche di reazione, la dispersione idrodinamica dovuta alla non buona distribuzione del flusso e le limitazioni al trasporto di materia e di calore.

In generale, i fenomeni coinvolti sono i seguenti:

- Trasporto della molecola dal seno della fase fluida all'interfaccia del supporto;
- Diffusione all'interno dei pori;
- Adsorbimento sui siti attivi;

- Desorbimento dai siti attivi;
- Diffusione della molecola verso l'esterno;
- Trasporto dall'interfaccia del supporto al seno della fase fluida.

Il contributo di ciascun fenomeno al reale svolgimento della separazione varia a seconda che si operi con colonne impaccate o con membrane, ed in base alle caratteristiche di ciascun processo di separazione: tipo di molecola e di ligando, condizioni operative.

La biomolecola da isolare attraverso una cromatografia di affinità entra in contatto con il ligando specifico seguendo un proprio meccanismo di trasporto che può essere di tipo diffusivo, perfusivo o convettivo (Figura 2.3) [42].

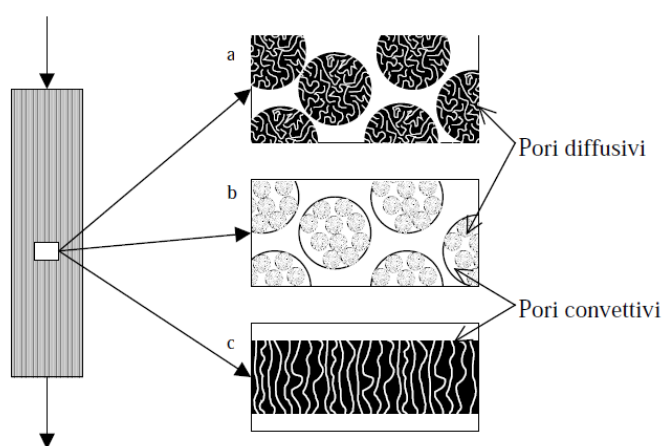


Figura 2.3 Schemi dei diversi tipi di meccanismi di trasporto. (a) particelle diffusive, (b) particelle perfusive, (c) membrane.

La tecnica più utilizzata per le separazioni di affinità è costituita da una colonna impaccata con particelle porose, caratterizzate da un diametro compreso tra i 50 e i 100 μm , su cui è immobilizzato il ligando.

In questo tipo di sistema il trasporto di materia è limitato dalla diffusione causata dai pori ciechi presenti nei beads. Questa situazione allunga i tempi di residenza delle proteine di interesse nelle diverse fasi cromatografiche e riduce l'efficienza del processo di separazione.

Tale limitazione potrebbe essere superata ricorrendo a particelle più piccole che offrono una maggior area superficiale e una minor distanza diffusiva, ma questo sistema comporterebbe un incremento delle perdite di carico con un incremento dei costi.

Un'alternativa alla cromatografia di affinità basata sull'utilizzo di particelle porose è costituita dalla cromatografia di affinità con particelle perfusive che si basa sull'uso di materiali di riempimento con struttura biodispersa su cui è immobilizzato il ligando. Queste particelle sono dotate di una rete di pori larghi, chiamati pori diretti, e una seconda rete di pori più piccoli, che rende intercomunicanti i pori diretti. Nelle particelle di tipo perfusivo la velocità convettiva non è nulla, ciò rende possibile superare le limitazioni tipiche dei processi puramente diffusivi.

A questi supporti cromatografici si aggiungono i supporti convettivi, membrane e monoliti, che rappresentano un significativo passo avanti nel superamento delle limitazioni descritte, permettendo un processo veramente efficiente.

Il processo con membrane di affinità si realizza attraverso l'utilizzo di sottili membrane microporose sovrapposte [43], rappresentanti la fase stazionaria, che costituiscono un sistema schematizzabile come una colonna larga e sottile. In questo tipo di supporto il ligando è immobilizzato principalmente sulla superficie interna dei pori, che hanno diametro medio compreso tra 0.4 e 3 μm . Attraverso i pori si realizza un flusso convettivo della soluzione che li attraversa, che riduce la resistenza al trasferimento di materia, superando le limitazioni associate alla diffusione [43-45].

Ciò permette la realizzazione di un processo che riduce i tempi delle fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione, diminuendo in questo modo la probabilità di denaturazione della biomolecola.

Inoltre, la struttura delle membrane consente di lavorare, durante il processo cromatografico, con basse perdite di carico e alte portate, ottenendo un'elevata produttività rispetto al processo convenzionale con colonna.

Tutti i vantaggi descritti associati all'utilizzo delle membrane di affinità si traducono in un abbattimento dei tempi e dei costi del processo.

2.4 Le membrane come supporto di affinità

Le membrane di affinità ideali dovrebbero rispondere ai requisiti tipici dei supporti di affinità descritti nel Paragrafo 2.1 ed avere la disponibilità di gruppi reattivi come i gruppi -OH, -NH₂, -SH, -COOH utili per l'immobilizzazione di ulteriori bracci spaziatori o di ligandi.

La preparazione di membrane di affinità, come la preparazione della fase stazionaria in colonne impaccate, si può riassumere in tre fasi principali [46], schematizzate in Figura 2.4:

1. Preparazione delle membrane di base
2. Attivazione delle membrane di base
3. Immobilizzazione del ligando di affinità sulle membrane attivate.

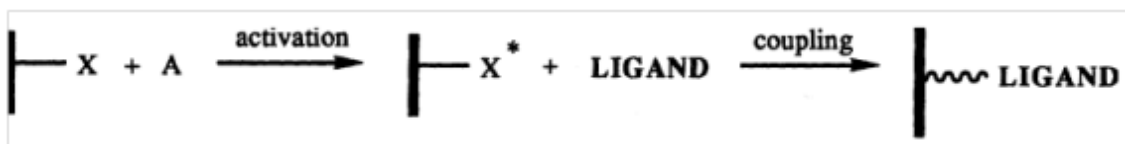


Figura 2.4 Schema della preparazione di membrane di affinità [47].

In commercio si trovano diversi materiali adatti alla produzione di membrane di affinità che possono essere materiali organici, polimerici, inorganici e compositi.

2.5 Membrane in cellulosa e cellulosa rigenerata

La cellulosa e i suoi derivati costituiscono substrati diffusi per la preparazione di membrane per le loro caratteristiche di reperibilità, facilità di funzionalizzazione e basso adsorbimento non specifico.

La cellulosa è un polimero che deriva da piante o da produzione batterica, possiede una struttura monomerica (Figura 2.5) con il glucosio legato tramite il legame 1-4 β glucosidico e ramificata in posizione 1-6 glicosidica alla catena adiacente [43]. Il polimero che ne deriva può essere visto come una serie di piani uguali sovrapposti e stabilizzati da legami idrogeno che lo rendono idrofilo e con gli ossidrili dei carboni C2, C3 e C5 disponibili per essere attivati con gruppi funzionali, epossidici o aldeidici, in modo da permettere l'immobilizzazione dei ligandi.

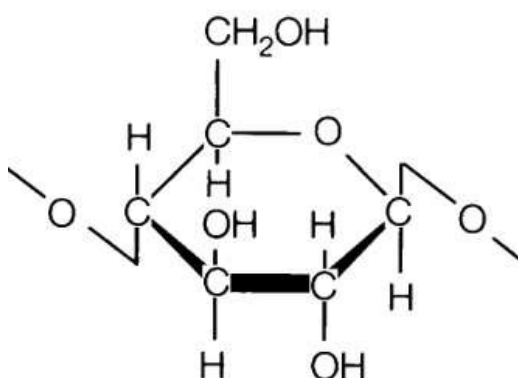


Figura 2.5 Monomero della cellulosa.

La morfologia della cellulosa viene studiata attraverso tecniche di microscopia elettronica SEM e TEM (scanning e transmission electron microscopy).

Attraverso questi studi è possibile ricavare informazioni sulla forma dei pori, sulla loro dimensione media, sulla loro distribuzione e sul volume totale dei vuoti. Si osserva che l'area totale disponibile (interna) è molto superiore a quella geometrica (esterna), infatti dati di letteratura riportano valori che vanno da 1 a 1000 m²/g, a seconda dell'origine del materiale, della storia del campione e della tecnica usata per la misura (raggi x, porosimetro a mercurio, assorbimento di gas e vapori) [48].

La cellulosa si presenta come un materiale relativamente resistente, non tossico, inodore e incolore, essa è insolubile in acqua e nei comuni solventi organici e rimane stabile in soluzioni acquose con pH neutro o leggermente alcalino. Dal punto di vista termico la struttura solida e le proprietà rimangono inalterate fino a 200°C.

I fenomeni di degradazione della cellulosa si manifestano in alcune condizioni estreme come in soluzioni acide attraverso la rottura del legame glucosidico; in soluzioni acquose in presenza di funghi o batteri contenenti enzimi che catalizzano la rottura idrolitica del legame glucosidico in acqua; durante processi di ossidazione.

Alle caratteristiche della cellulosa appena descritte, che la rendono un supporto adatto ai processi cromatografici, vanno aggiunti il facile smaltimento e l'economicità associati al suo utilizzo.

La cellulosa nativa così come descritta presenta dei limiti associati alla sua idrofilicità, infatti essa riesce ad assorbire acqua solo per il 30%-40% con un corrispondente basso grado di rigonfiamento che risulta in una bassa superficie di pori a disposizione [49]. Questa limitazione si supera sottoponendo le membrane di cellulosa a specifici trattamenti di decristallizzazione e ricristallizzazione che permettono la rigenerazione della cellulosa.

Per tutti i motivi descritti si comprende come un supporto di questo genere si presterebbe perfettamente all'applicazione prevista in questa ricerca.

CAPITOLO 3

STRUMENTI E TECNICHE SPERIMENTALI

L'attività sperimentale è stata svolta grazie all'ausilio di strumenti e tecniche specifiche che hanno permesso la realizzazione dei processi di interesse, quali la modifica e la caratterizzazione delle membrane; e di strumenti e tecniche analitiche attraverso cui è stato possibile valutare l'efficienza dei processi di immobilizzazione e la qualità dei processi di separazione eseguiti.

3.1 Agitatore termostatico

Nella fase preliminare della sperimentazione dei protocolli di modifica delle membrane, la reazione di immobilizzazione è avvenuta ricorrendo ad un sistema costruito artigianalmente allo scopo, schematizzato in Figura 3.1.

Il sistema era costituito da un cilindro in vetro pyrex contenente il tampone di reazione con le membrane, chiuso ed immerso in un bagno termostatico impostato alla temperatura richiesta dalla reazione, posizionato su un agitatore magnetico in modo da consentire l'agitazione continua delle membrane.

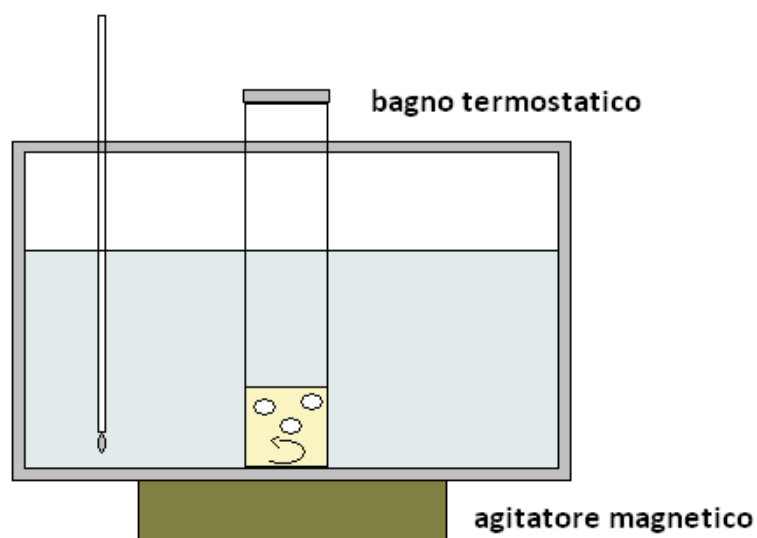


Figura 3.1 Sistema semplificato per la modifica delle membrane.

In seguito, verificata l'efficacia del protocollo di modifica delle membrane, al fine di migliorare l'efficienza del processo, il sistema artigianale appena descritto è stato sostituito con un sistema strutturato costituito da un bagno termostatico agitato JULABO SW 2 (Figura 3.2), le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 3.1.



Figura 3.2 Agitatore JULABO SW 23.

Tabella 3.1 Caratteristiche del bagno termostatico JULABO SW 2.

Temperatura	Stabilità della temperatura	Potenza	Volume	Frequenza di agitazione
20-99.9°C	± 0.02 °C	1 kW	8-20 L	20-200 rpm

Questo strumento adatto al funzionamento in continuo senza sorveglianza, è in grado di garantire una elevata stabilità di temperatura ed una costante e continua agitazione.

3.2 Spettrofotometro e misure spettrofotometriche

Le concentrazioni delle soluzioni proteiche e delle soluzioni provenienti da saggi colorimetrici sono state determinate ricorrendo a misure spettrofotometriche in corrispondenza di specifiche lunghezze d'onda: 280 nm per le soluzioni proteiche e 485 nm per le soluzioni derivanti dal saggio colorimetrico.

La tecnica spettrofotometrica si basa sul fatto che ogni sistema molecolare assorbe una radiazione elettromagnetica avente una specifica lunghezza d'onda a seconda della propria distribuzione dei livelli energetici e sul fatto che quando questa radiazione caratteristica attraversa una soluzione essa viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione.

Per soluzioni diluite il valore dell'assorbanza registrato dallo spettrofotometro risulta essere proporzionale alla concentrazione e può essere descritta dalla legge di Lambert e Beer:

$$Abs(\lambda) = \epsilon l c$$

dove $Abs(\lambda)$ è il valore di assorbanza letto dallo strumento di misura in corrispondenza della lunghezza d'onda λ , c (mol/L) è la concentrazione in soluzione, l (cm) è lo spessore della cella di misura, ed ϵ (L/cm·mol) è il coefficiente di proporzionalità detto anche coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda λ ed è in genere misurato tramite rette di taratura a concentrazioni note ed ovviamente risulta essere caratteristico per ogni sostanza. Anche se l'assorbanza è un numero puro, solitamente si usa l'unità di assorbanza, AU (Absorbance Unit), come unità di misura.

Lo strumento utilizzato per svolgere le analisi è uno spettrofotometro UV-Visibile 1601 della Shimadzu a doppio raggio, schematizzato in Figura 3.3; il fascio di luce, dopo essere passato attraverso il monocromatore, viene scomposto in due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco; un sistema elettronico esegue il confronto automatico ad ogni lunghezza d'onda dell'assorbimento delle due celle e sottrae il valore dell'assorbimento del solvente a quello della soluzione.

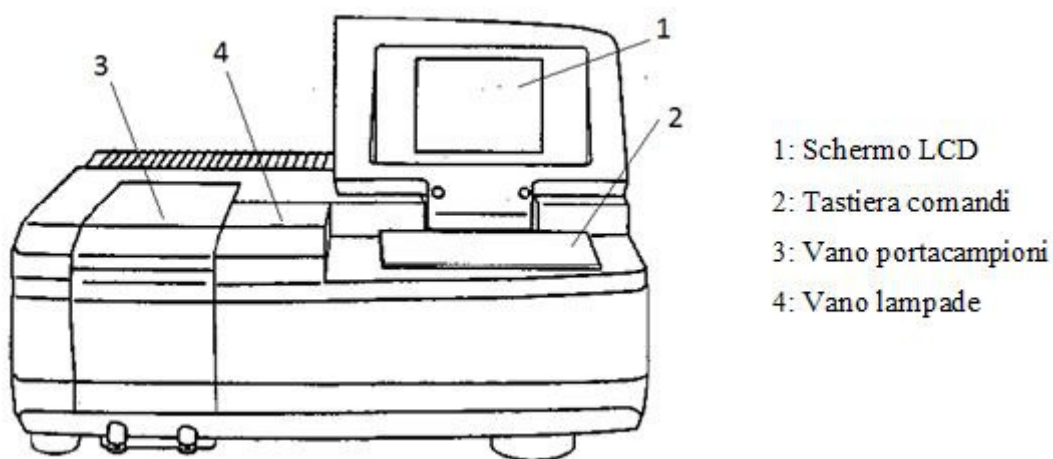


Figura 3.3 Schema dello spettrofotometro Uv-Vis Shimadzu.

In particolare, durante l'attività di ricerca descritta nella presente tesi, la quantità di proteina eluita è stata valutata a partire dall'area sottesa dal picco di eluzione, registrato dal sistema FPLC ÄKTA Purifier e calcolata con l'ausilio del software Unicorn™, descritti nei paragrafi successivi, secondo la formula:

$$m_{ELU} = A_{ELU} / k_{\epsilon}$$

in cui A_{ELU} rappresenta l'area del picco di eluizione, k_{ϵ} il fattore di conversione tra la lettura dell'assorbanza a 280 nm con lo spettrofotometro Shimadzu e la lettura della stessa assorbanza con il sistema FPLC, necessario a causa dei diversi cammini ottici delle celle UV dei due strumenti [44].

Il valore fattore di conversione è risultato pari a 548 mAU·mL/mg ed è stato calcolato come prodotto tra il coefficiente di estinzione per il plasminogeno reperito in letteratura [50] per uno spettrofotometro con lo stesso cammino ottico dello spettrofotometro Shimadzu e il coefficiente di estinzione per l'FPLC, calcolato confrontando la lettura dell'assorbanza di campioni di proteina noti con i due strumenti. Si noti che non è stato possibile ricavare i coefficienti di estinzione attraverso rette di taratura, come prevede una corretta procedura, a causa dell'elevato costo del plasminogeno puro.

In questo modo è stato possibile avere una stima della quantità di proteina eluita dai due supporti, assumendo che tutta la proteina fosse plasminogeno.

3.2.1 Saggio colorimetrico per la valutazione della quantità di ligando immobilizzato

Concluse le fasi di modifica delle membrane scelte come supporto cromatografico, si è reso necessario individuare un metodo capace di stabilire

l'efficienza dei processi di immobilizzazione realizzati, valutando la quantità di ligando (L-lisina) immobilizzato.

Seguendo le indicazioni di studi raccolti in letteratura [51, 52], al fine di determinare il contenuto di ammine presente sulle membrane è stato applicato un saggio colorimetrico che utilizza l'acido arancio 7 (Orange II, Sigma) come indicatore.

Il saggio si basa sulla proprietà del colorante acido arancio 7 di legarsi, per mezzo del suo gruppo SO_3^- al gruppo NH_3^+ disponibile della L-lisina immobilizzata (Figura 3.4).

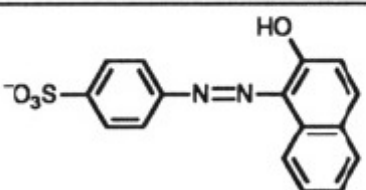
anion (abbrev)	structure	MW	λ_{max} (nm)
C.I. Acid Orange 7 (mono- SO_3^-)		350.3	485

Figura 3.4 Struttura e caratteristiche della'acido arancio 7 [51].

Pertanto, una membrana modificata campione è stata immersa in una soluzione acquosa $5 \cdot 10^{-4}$ M di acido arancio 7, portata a pH 3 con HCl (Figura 3.5).

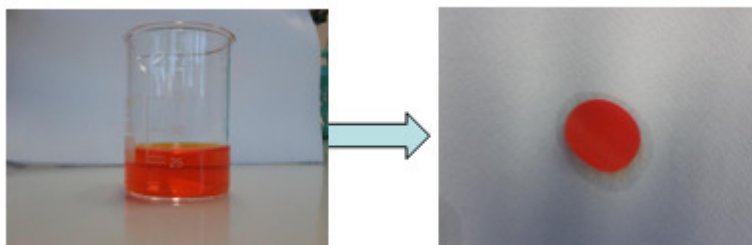


Figura 3.5 Reazione del colorante acido arancio 7 con la membrana modificata.

Dopo aver tenuto la soluzione in agitazione a temperatura ambiente per 24 h, tempo sufficiente per garantire alla reazione di raggiungere l'equilibrio, la membrana è stata lavata abbondantemente con acqua distillata e immersa in una soluzione di volume noto di 10^{-3} M di NaOH, in agitazione a temperatura ambiente, al fine di desorbire il colorante (Figura 3.6).

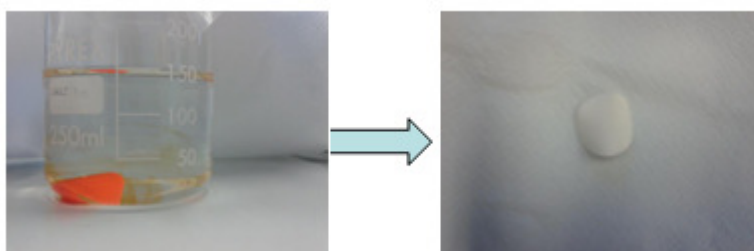


Figura 3.6 Desorbimento del colorante acido arancio 7 dalla membrana.

La densità ottica della soluzione ottenuta in questo modo, è stata misurata con lo spettrofotometro Shimadzu UV-1601 UV-Visible in corrispondenza della lunghezza d'onda di 485 nm.

Infine, la densità dei gruppi amminici è stata determinata con l'aiuto di una retta di calibrazione (Appendice A.2) e assumendo che l'acido sia complessato con un numero equivalente di moli del gruppo amminico.

Con l'intento di tener conto delle eventuali molecole di colorante intrappolate nella struttura porosa delle membrane, anche le membrane originarie, non modificate con la L-lisina, sono state sottoposte al medesimo saggio colorimetrico con l'acido arancio 7.

Il valore dell'assorbanza della soluzione risultante da questo saggio (0.0054 ± 0.0013 AU) è diventato il valore del bianco da sottrarre ad ogni successiva misura spettrofotometrica dei campioni analizzati.

3.3 Sistema FPLC

La caratterizzazione delle membrane è stata eseguita mediante un sistema FPLC, acronimo di Fast Liquid Protein Chromatography.

La Fast Protein Liquid Chromatography è un tipo di cromatografia liquida in cui la velocità di passaggio del sovente attraverso la fase stazionaria è impostata a computer, realizzata da pompe e mantenuta costante grazie ad un insieme di controlli.

Questo sistema può essere utilizzato con ogni tipo di supporto cromatografico (colonne, moduli a membrana), allo scopo di separare proteine o altre molecole su scala di laboratorio.

Il nome commerciale del sistema FPLC utilizzato è ÄKTA Purifier 100 (GE Healthcare). L'unità cromatografica è composta da tre moduli principali sovrapposti (Figura 3.7).

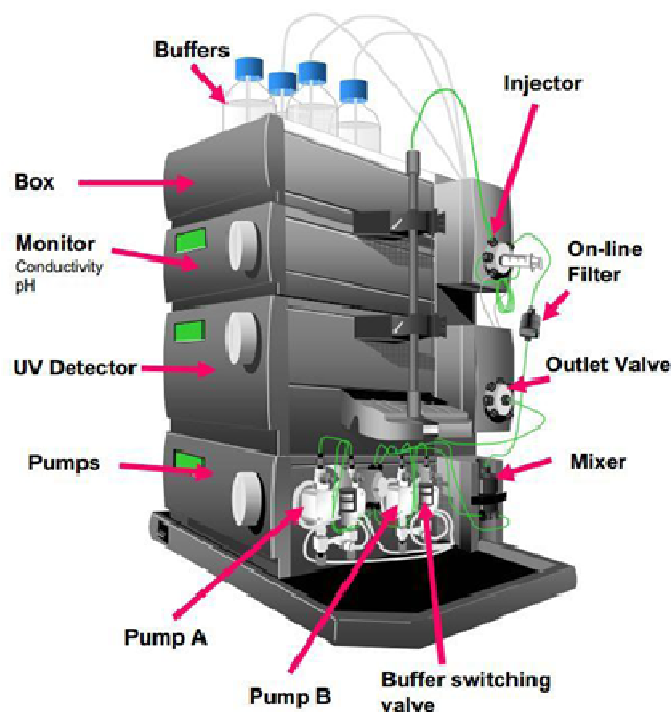


Figura 3.7 Struttura schematica del sistema FPLC ÄKTA Purifier 100.

Dal basso verso l'alto i moduli sono:

- Sistema di pompe P-900, costituito da due coppie di pompe alternative a pistone ad alte prestazioni in grado di raggiungere una portata di 100 mL/min ed una pressione massima di 100 bar.
- Monitor UV-900, un rivelatore di assorbanza a lunghezza d'onda multipla, capace di monitorare contemporaneamente tre diverse lunghezze d'onda nell'intervallo da 190 a 700 nm;
- Monitor pH/C-900, un rivelatore combinato per la misurazione in linea del pH e della conducibilità.

Ai moduli si aggiungono altri accessori quali le valvole, un miscelatore e la colonna cromatografica.

Il sistema di pompe è costituito da 4 testate, due per la coppia di pompe A e altre due per la coppia B. Ogni coppia di pompe lavora in parallelo per garantire che la portata sia costante. Il sistema di pompe A può processare due diverse linee, rispettivamente indicate A1 e A2, e altrettanto per le pompe B, che movimentano le soluzioni collegate alle linee B1 e B2. La scelta tra la linea 1 e 2 è determinata dalla posizione di una valvola di switch.

Le soluzioni provenienti dalle due linee sono omogeneizzate in un miscelatore magnetico, vengono filtrate attraverso un filtro in polipropilene con dimensione dei pori di 2 μm e giungono alla valvola di iniezione. Come mostrato in Figura 3.8, la valvola di iniezione può assumere tre posizioni differenti.

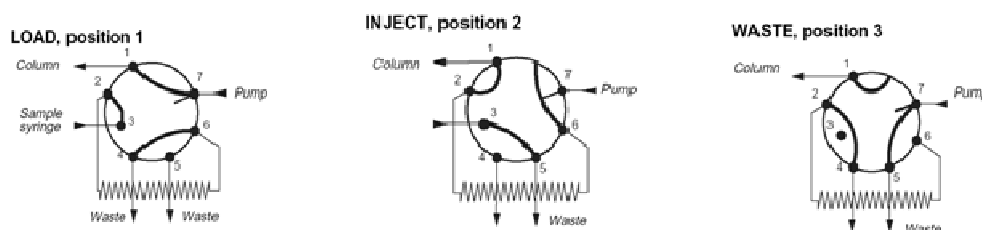


Figura 3.8 Posizioni che può assumere la valvola di iniezione.

Quando la valvola si trova in posizione di Load, il tampone proveniente dalle pompe viene alimentato alla colonna cromatografica. In questa posizione è possibile caricare il campione dalla porta 3 mentre la colonna viene equilibrata. Tra le porte 2 e 6 è posto il contenitore del campione, che può essere un semplice tubo di volume noto (loop) oppure un superloop.

Quando la valvola si sposta nella posizione Inject il campione è spinto alla colonna cromatografica dal flusso del tampone, mentre quando la valvola è in Waste la colonna è esclusa dal circuito e la soluzione pompata viene raccolta nello scarico. Questa posizione è utile quando è necessario cambiare tampone e si devono lavare i volumi a monte della colonna.

Superata la valvola di iniezione, il flusso è diretto alla colonna, quindi attraversa il rilevatore di assorbanza, di conducibilità e del pH, necessari per monitorare le caratteristiche della soluzione in uscita dalla colonna.

Alla fine del circuito si trova una valvola ad otto porte, in base alla posizione della valvola di uscita è possibile dirigere il flusso ad un apposito raccoglitore di frazioni ad altri elementi di raccolta della soluzione processata o più semplicemente allo scarico.

Il sistema può lavorare con impostazioni manuali adatte a processi che necessitano di monitoraggio come la caratterizzazione dei supporti cromatografici, come nel caso dell'attività di ricerca descritta in questo lavoro, oppure seguendo un metodo preimpostato nel software di gestione UnicornTM nel caso di processi sistematici.

3.3.1 Software di gestione Unicorn™

Unicorn™ è il programma utilizzato per il controllo dell'unità cromatografica e per l'elaborazione dei risultati. Si presenta all'utente con una struttura a quattro finestre:

- Manager: questa finestra costituisce il sistema di gestione dei documenti; è impostata secondo due colonne, una in cui si trovano i metodi di lavoro per l'esecuzione degli esperimenti e la seconda dove sono salvati i risultati delle prove effettuate;
- Method editor: in questa finestra è possibile creare, modificare e salvare i metodi di lavoro;
- System control: questa è forse la finestra più importante; infatti permette di seguire i risultati degli esperimenti in tempo reale e di modificare i parametri operativi manualmente e con effetto immediato sul processo;
- Evaluation: questa finestra permette una semplice e comoda elaborazione dei risultati di un esperimento. Si possono eseguire operazioni come la normalizzazione della curva, l'integrazione dell'area sottostante ai picchi, la minimizzazione delle interferenze del rumore sul segnale registrato ecc.

I risultati possono essere esportati in altri programmi come fogli di lavoro o file di testo per una successiva elaborazione.

3.4 Sistema HPLC

I campioni raccolti dal processo cromatografico sono stati sottoposti ad analisi SEC realizzate con un sistema HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) Waters 2695 XE.

La cromatografia liquida ad alta risoluzione è una moderna tecnica cromatografica in cui, grazie all'esercizio di una forte pressione, la fase mobile avanza lungo una colonna riempita con una fase stazionaria di granulazione finissima.

Una rappresentazione semplificata di un HPLC è riportata in Figura 3.9.

In primo luogo si trova un sistema di pompe, necessario per la movimentazione della fase mobile, ed un iniettore del campione da analizzare.

La colonna costituisce il fulcro dello strumento poiché in questo elemento ha luogo la separazione. Infine un apposito rivelatore misura la quantità dei componenti in uscita, e il segnale viene registrato da un computer.

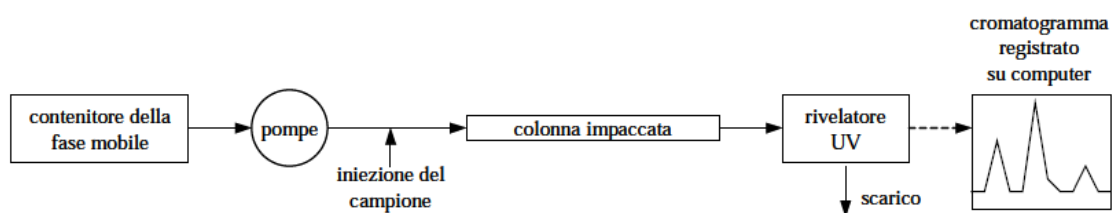


Figura 3.9 Rappresentazione schematica di un sistema HPLC.

I vantaggi dell'HPLC possono essere così riassunti:

- Brevi tempi di esecuzione;
- Riproducibilità delle condizioni sperimentali (affidabilità dell'apparecchiatura);
- Dimensione ridotta della colonna (si evitano problemi di deviazioni longitudinali e di percorsi alternativi);
- Analisi di campioni di volume molto ridotto (20-100 μL);
- Possibilità di rilevare piccolissime quantità di sostanze grazie all'alta sensibilità dei rilevatori che si utilizzano;
- Relativa semplicità d'uso.

Il sistema HPLC Waters 2695 XE (Figura 3.10) utilizzato è composto dai seguenti elementi principali:

- un degasatore: i solventi vengono degasati prima di entrare nel circuito di analisi;
- una pompa: due pistoni in serie (per uniformare la portata) collegati, attraverso quattro linee e ad una valvola miscelatrice, ai recipienti contenenti i solventi;
- un iniettore: collegato alla sommità della colonna analitica, che provvede all'introduzione dei campioni da analizzare;
- un porta campioni: cinque caroselli (piatti rotanti) in grado di alloggiare fino a 125 vials, in cui vengono caricati i campioni da analizzare;
- un termostato: si tratta di un termostato ad effetto Peltier, in grado di raffreddare (fino a 4 °C) l'ambiente dei campioni;
- la colonna analitica, scelta in base all'analisi che si vuole compiere,
- il rivelatore: è un rivelatore UV in grado di lavorare a doppia lunghezza d'onda.

Le analisi del sistema HPLC sono controllate dal software Empower che consente di processare in un secondo momento i dati raccolti e registrati.

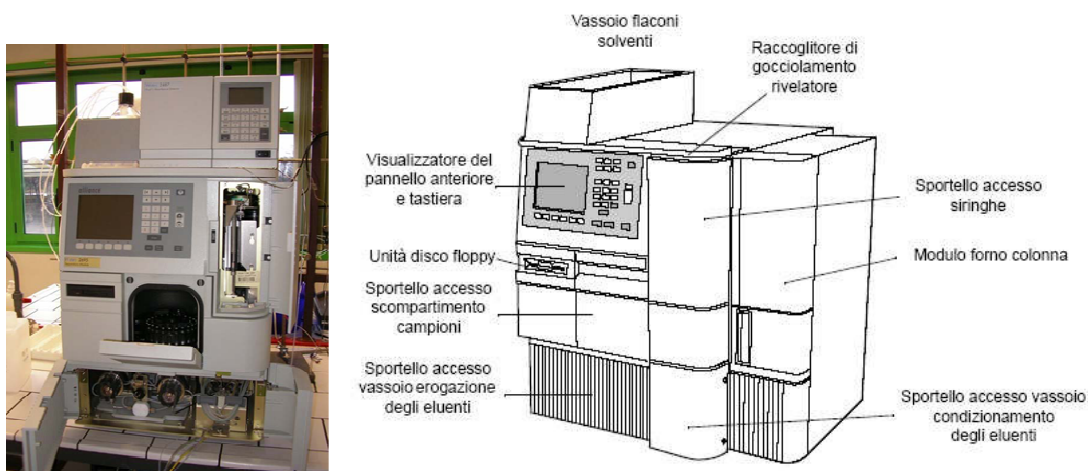


Figura 3.10 Modulo di separazione Waters 2695 XE (lato anteriore).

3.4.1 Analisi SEC

I campioni di eluato raccolti dalle prove di cromatografia di affinità realizzate durante l'attività sperimentale sono stati analizzati usando una colonna ad esclusione di forma, detta anche SEC (Size Exclusion Chromatography) impaccata con un materiale altamente poroso.

Il principio di separazione sfrutta le caratteristiche del riempimento, come descritto nel Paragrafo 1.2.2, per cui una molecola di grosse dimensioni è esclusa dai pori delle particelle e fluisce solo attraverso gli spazi interstiziali, mentre le molecole di piccole dimensioni si distribuiscono anche all'interno del riempimento e dunque attraversano la colonna con una velocità minore.

In uscita dalla colonna SEC emergeranno prima le molecole di grandi dimensioni e poi quelle di dimensioni minori.

Questa tecnica è solitamente qualitativa, anche se una quantificazione di massima è possibile sulla base della dimensione dei picchi dei composti in uscita dalla colonna.

La colonna usata per queste analisi è la colonna BioSuite™ 250 UHR SEC prodotta da Waters. Si tratta di una colonna ad altissima risoluzione adatta all'analisi di proteine e peptidi, le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 3.2.

Tabella 3.2 Caratteristiche della colonna SEC.

Colonna SEC	Matrice di riempimento	Dimensione dei granuli (µm)	Diametro int. Colonna (mm)	Lunghezza (mm)	Portata (mL/min)
BioSuite™	Silice	4 µm	4.6 mm	300	0.1/0.4

La colonna BioSuite™ 250 UHR SEC è stata montata in serie ad una specifica precolonna BioSuite™ al fine di ottimizzare il funzionamento della colonna stessa.

3. 5 Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica di separazione di proteine, che consente di distinguere le proteine presenti in una miscela in base alla diversa velocità di migrazione delle molecole elettricamente cariche sotto l'influenza di un campo elettrico.

In particolare una proteina in soluzione, ad qualsiasi pH diverso da quello del punto isoelettrico, presenta una carica netta q diversa da zero.

Sotto l'azione di un campo elettrico E sulla proteina agirà una forza $q E$ che tenderà a muovere la proteina stessa, opponendosi alle forze viscosse della soluzione. In regime di stato stazionario, si avrà che:

$$q E = 6 \pi \eta R v$$

dove η rappresenta la viscosità della soluzione, R il raggio della particella (raggio di Stokes) e v la velocità della proteina nella soluzione.

La velocità di migrazione delle proteine dipende dalla mobilità elettroforetica, definita dal rapporto tra la velocità della particella v ed il campo elettrico applicato E , quindi sfruttando l'equazione precedente si ottiene che:

$$\frac{v}{E} = \frac{q}{6 \pi \eta R}$$

La mobilità elettroforetica, essendo una funzione dipendente dalla carica e dal raggio, è una grandezza caratteristica di ogni molecola, quindi applicando un campo elettrico ad una miscela ionica, le varie specie migreranno con velocità diversa a seconda delle rispettive mobilità.

La separazione elettroforetica è generalmente realizzata utilizzando gel polimerici. La poliacrilamide è il polimero più utilizzato per l'elettroforesi di proteine con peso molecolare compreso tra 5 e 200 kDa.

Questo gel presenta una notevole resistenza meccanica, una completa trasparenza che resta anche quando viene seccato e soprattutto la sua porosità può essere controllata in modo da modulare l'effetto di setaccio molecolare.

In un gel con capacità di setaccio molecolare aumenta la differenza di mobilità tra proteine di diverso peso molecolare: la resistenza al movimento di una particella aumenta all'aumentare delle dimensioni della particella stessa.

3.5.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

L'SDS-PAGE rappresenta la tecnica elettroforetica più comune tra quelle condotte su gel a base di poliacrilammide. Essa si basa sull'analisi di proteine denaturate attraverso l'utilizzo di SDS (sodio dodecil solfato), che è un detergente anionico, che possiede una carica netta negativa, capace di denaturare la proteina facendole perdere la propria struttura tridimensionale (Figura 3.11).

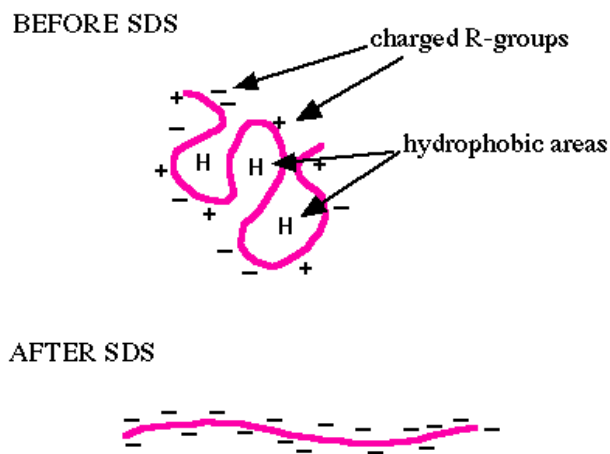


Figura 3.11 Processo di denaturazione della proteina sotto l'azione dell'SDS.

In questo modo si formano complessi SDS-proteine, in un rapporto di circa una molecola di SDS per ogni due residui di amminoacidi. Tale rapporto conferisce al complesso tra l'SDS e la proteina denaturata una carica negativa netta approssimativamente proporzionale alla massa della proteina stessa (indicativamente 180 cariche negative per ogni 40 kDa).

La carica negativa acquisita con il legame con l'SDS è in genere molto maggiore della carica della proteina nativa, che diventa quindi trascurabile.

Generalmente si utilizza un gel a gradiente, ossia un gel con una diversa distribuzione dei pori da un estremo all'altro: nella zona vicina ai pozzetti, in cui vengono caricati i campioni, si ha la percentuale più bassa di poliacrilammide, percentuale che aumenta progressivamente spostandosi verso il fondo del gel. Questa struttura favorisce la separazione delle proteine, permettendo solo alle proteine più piccole di raggiungere il fondo del gel (Figura 3.12).

Tra i supporti disponibili in commercio durante l'attività è stato utilizzato il Tris-HCl Criterion Gels 4-20% Linear Gradient (Bio-Rad 345-0033).

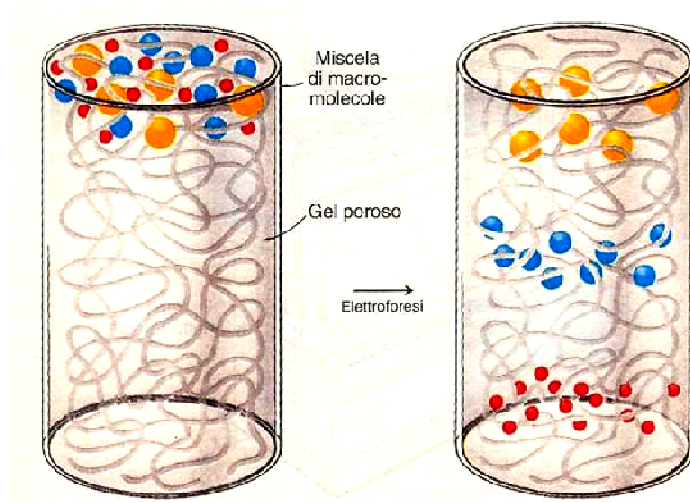


Figura 3.12 Migrazione delle proteine su gel sotto l'azione di un campo elettrico.

Il gel viene assemblato nell'apparato per l'elettroforesi, rappresentato essenzialmente da una cella elettroforetica riempita con una soluzione elettrolitica.

Dopo aver preparato e introdotto i campioni nei pozzetti, tra i due elettrodi, presenti nella cella, viene applicata una differenza di potenziale per mezzo di un alimentatore che genera un gradiente di potenziale elettrico (Figura 3.13).



Figura 3.13 Apparato BioRad per l'elettroforesi utilizzato.

In queste condizioni, proteine con dimensioni molecolari differenti migreranno in maniera diversa. Per monitorare la progressione della corsa elettroforetica uno o più pozzetti vengono generalmente dedicati ai markers, ovvero miscele di proteine precolorate e di peso molecolare noto, capaci di indicare la migrazione di proteine di peso molecolare simile.

Dopo un certo intervallo di tempo (circa 2 h) si raggiungerà una separazione dei singoli componenti in base alla loro mobilità elettroforetica, che saranno visualizzati mediante opportuni metodi di colorazione.

La procedura più comune di rivelazione delle bande proteiche è la colorazione con Blu Coomassie (*Bio-Safe Coomassie, Bio-Rad 161-0786*). Il Blu Coomassie si lega alle proteine attraverso legami ionici tra i gruppi sulfonici del colorante e i gruppi amminici delle proteine oltre che attraverso forze di Van der Waals. Pertanto dopo aver estratto il gel dalla cella elettrolitica, esso viene immerso nel colorante, che reagisce rendendo blu l'intero gel, che poi viene decolorato con ripetuti lavaggi in acqua demineralizzata, lasciando emergere solo le bande proteiche come descritto in Figura 3.14. A questo punto, il gel viene fotografato, sottoposto a scansione ottica o essiccato per conservare i risultati.

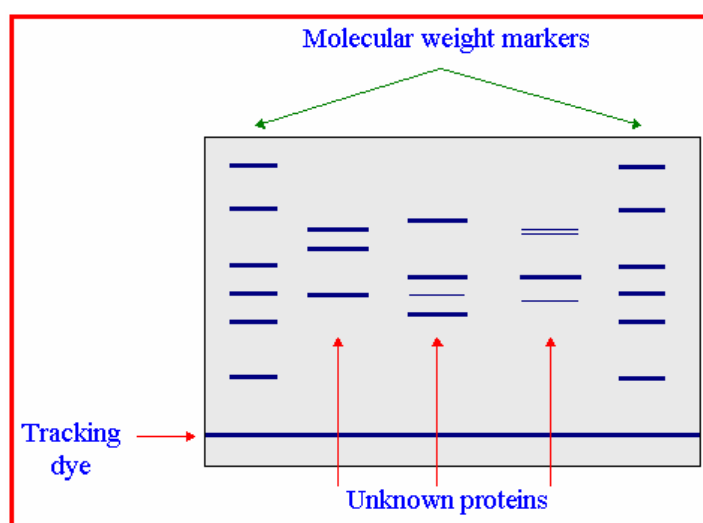


Figura 3.14 Bande proteiche emerse dopo un'elettroforesi.

Dalla lettura delle bande si ottiene un'indicazione della purezza dei campioni iniettati e dei pesi molecolari delle proteine presenti. Sebbene si tratti di una tecnica qualitativa, dalle dimensioni delle bande è anche possibile avere una stima molto approssimata della quantità di proteina presente.

3.6 Reagenti e soluzioni

Come accennato nei paragrafi precedenti i reagenti usati per le analisi elettroforetiche sono tutti prodotti di BioRad Laboratories.

I reagenti necessari alla preparazione delle soluzioni, descritte in Appendice A.1, utilizzate durante tutte le attività sperimentali sono stati acquistati da Sigma Aldrich. Tutte le soluzioni preparate sono state filtrate con filtri in nitrato di cellulosa da 0.45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH).

Si sottolinea che anche i ligandi (L-lisina e L-lisina HCl) usati per la preparazione delle membrane e il siero bovino e umano usati per la caratterizzazione delle stesse sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

Durante la sperimentazione è stato usato anche siero umano fornito dall'Arcispedale di Reggio Emilia che è stato filtrato con filtri a siringa Millex da 0.22 μm (Millipore), a differenza del siero umano e bovino acquistati che invece erano già filtrati.

Si precisa che tutti i campioni analizzati con l'HPLC sono stati filtrati con filtri a siringa Millex da 0.22 μm (Millipore) per ridurre il più possibile l'intasamento della colonna SEC.

CAPITOLO 4

Preparazione e caratterizzazione delle membrane di affinità: PROTOCOLLO I

Il Capitolo 4 è dedicato alla descrizione del processo di modifica delle membrane scelte per la purificazione del plasminogeno da siero umano e alla loro successiva caratterizzazione in condizioni dinamiche. Particolare attenzione è rivolta all'analisi dei risultati al fine di valutare le prestazioni delle membrane modificate.

4.1 Il supporto: Membrane Sartobind Epoxy® Sartorius

In commercio si trovano vari materiali pre-attivati, quali resine, monoliti e membrane, dotati di specifici gruppi reattivi che permettono l'immobilizzazione del ligando. Per l'attività sperimentale sono state scelte le membrane in

cellulosa Sartobind Epoxy® prodotte da Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, Germania) [53].

Queste membrane presentano un'attivazione epossidica adatta all'immobilizzazione del ligando specifico individuato per la separazione del plasminogeno. In particolare i gruppi epossidici reagiscono facilmente con i gruppi come – OH e – NH₂ attraverso l'apertura dell'anello.

Le membrane Sartobind Epoxy® hanno una matrice in cellulosa rigenerata rinforzata e stabilizzata.

Vengono attivate attraverso la tecnica del grafting, utilizzando un monomero epossidico che funge da braccio spaziatore che fornisce i gruppi funzionali per il successivo attacco del ligando prescelto.

La Figura 4.1 mostra la struttura di queste membrane ottenuta attraverso una scansione realizzata con microscopio elettronico (SEM). Le membrane Sartobind Epoxy® possiedono uno spessore medio di circa 230 µm e una dimensione media dei pori di 0.45 µm, come riportato in tabella 4.1; inoltre sono caratterizzate da una porosità di circa il 63%.

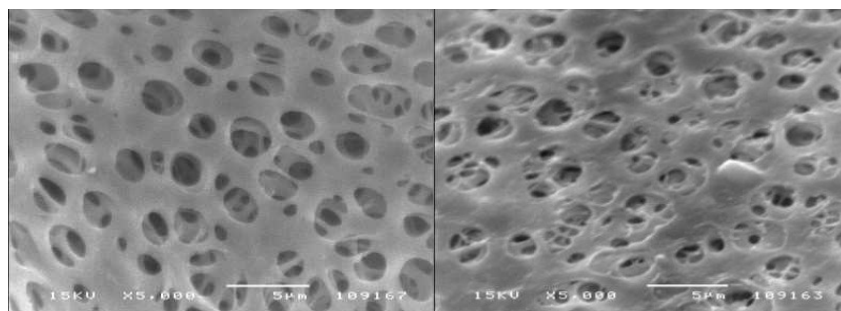


Figura 4.1 Scansioni al microscopio elettronico delle membrane SartobindEpoxy® (ingrandimento 5 X) eseguite dal lato superiore (a sinistra) ed inferiore (a destra). Micrografie eseguite dal Membrane Technology Group e dell'Università di Twente.

Tabella 4.1 Proprietà delle membrane Sartobind Epoxy®.

Spessore (μm)	Densità (g/cm^3)	Area _{BET} (m^2/g)	Dim. media pori (μm)	Capacità di legame (mg/mL)	Densità gruppi epossidici ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)
230	0.413	2.25	0.45	1.1 – 5.5	3.4 – 95.65

4.2 Il ligando: L-lisina

La cromatografia di affinità permette di separare il plasminogeno da una miscela biologica complessa, come il plasma o il siero, sulla base dell'interazione reversibile che si stabilisce tra il plasminogeno e uno specifico ligando, quale la L-lisina [54], isomero levogiro dell'amminoacido lisina (Figura 4.2) [55], avente peso molecolare pari a 146.19 g/mol.

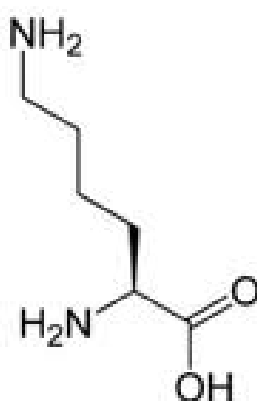


Figura 4.2 Struttura della L-lisina.

Il plasminogeno presenta in totale 5 siti di legame per la lisina dislocati sulla molecola; in particolare, il sito disposto sul kringle 4 mostra una forte affinità per la lisina mentre gli altri formano interazioni deboli [56, 57].

4.3 Reazione di immobilizzazione del ligando sulle membrane

Il processo di immobilizzazione è stato realizzato sperimentando e ottimizzando due distinti protocolli reperiti in letteratura [58, 59]. Entrambi i protocolli consentono l'immobilizzazione della L-lisina attraverso il suo gruppo α -amminico che reagisce con i gruppi epossidici presenti sulle membrane, lasciando i gruppi ϵ -amminico ed α -carbossilico liberi di interagire con il plasminogeno durante la fase di adsorbimento del processo cromatografico, come descritto nella Figura 4.3.

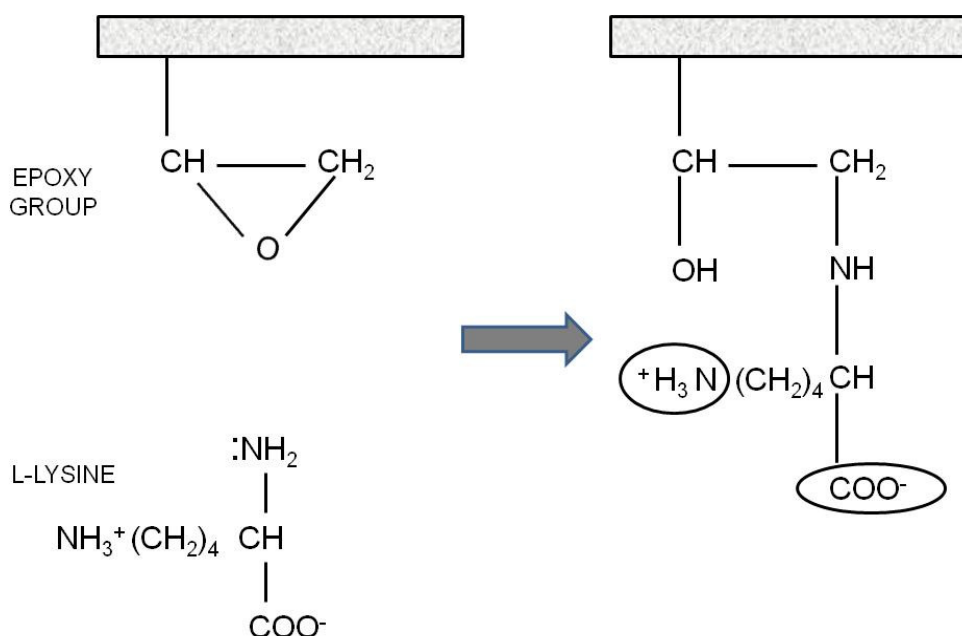


Figura 4.3 Schema della reazione di immobilizzazione.

4.4 Protocollo I

Il primo tentativo di immobilizzare la L-lisina sulle membrane Sartobind Epoxy® è stato realizzato adattando un protocollo reperito in letteratura, denominato in questo lavoro Protocollo I. Questo protocollo è stato utilizzato da T. Younga *et al.* per immobilizzare L-lisina su membrane microporose in PVDF attivate per mezzo di gruppi epossidici, con l'intento di ricreare ambienti simili alla matrice extracellulare per coltivare cellule neuronali [58].

Anche se l'obiettivo della modifica di queste ultime membrane è palesemente diverso dalla modifica di membrane da utilizzare come supporto cromatografico per la purificazione di proteine, la procedura di modifica applicata è stata reputata un buon punto di partenza per l'immobilizzazione di L-lisina su membrane epossidiche in genere.

La modifica delle nostre membrane, in accordo con il Protocollo I, è stata realizzata dapprima su gruppi di 3 dischi di membrana del raggio di 0.75 cm, lasciati a bagno in acqua distillata per tutta la notte a temperatura ambiente e poi immersi in una soluzione acquosa contenente per il 50% in volume 1,4-diossano e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$ a pH 10 e L-lisina. La reazione di immobilizzazione avviene ad una temperatura di 80°C, mantenendo le membrane in agitazione.

Secondo questo protocollo, terminata la reazione di immobilizzazione della L-lisina, dopo un primo lavaggio in abbondante acqua distillata, le membrane vengono lasciate in acqua distillata per 24 h, a temperatura ambiente e in agitazione al fine di rimuovere i residui di L-lisina che non hanno reagito con i gruppi epossidici.

Quindi, le membrane vengono lavate con isopropanolo e successivamente con esano e posizionate tra due fogli di carta da filtro per essere asciugate in forno alla temperatura di 50°C per 15 minuti.

Al fine di valutare l'efficienza del processo di modifica delle membrane, l'immobilizzazione è stata realizzata variando la durata della reazione da 24 h a 54 h, mantenendo fissa a $2 \cdot 10^{-3}$ M la concentrazione di L-lisina in soluzione; e variando la concentrazione di L-lisina in soluzione da $2 \cdot 10^{-3}$ M a 0.5 M, lasciando fissa la durata della reazione a 48 h.

4.4.1 Studio dell'efficienza dell'immobilizzazione

L'efficienza dell'immobilizzazione, intesa come densità di ligando immobilizzato, è stata studiata variando due parametri chiave del processo di modifica delle membrane: la durata della reazione di immobilizzazione e la concentrazione di L-lisina nella soluzione di partenza.

Il primo studio è stato condotto sulla densità di ligando in funzione della durata della reazione di immobilizzazione, che è stata variata da 24 h a 54 h, come riportato in Tabella 4.2, mantenendo costante la concentrazione di lisina in soluzione e pari a $2 \cdot 10^{-3}$ M.

Tabella 4.2 Tabella riassuntiva della modifica delle membrane con il Protocollo I.

	IMMOBILIZZAZIONE					LAVAGGIO	ASCIUGATURA
PROTOCOLLO I	Tampone di reazione	pH	T (°C)	Durata (h)	C _{lisina} (M)	Acqua Isopropanolo Esano	T = 50 °C per 15min
	Soluzione acquosa L-lisina/Na ₂ B ₄ O ₇ / NaOH/ 1.4-Diossano	10	80	24 38 48 54	0.002 0.002 0.002, 0.02, 0.2, 0.5 0.002		

Dai risultati, riportati in Figura 4.4, si nota che la densità di ligando immobilizzato aumenta con la durata dell'immobilizzazione fino a raggiungere il

valore di $7.89 \pm 1.51 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ in corrispondenza delle 48 h. Oltre questo valore di tempo, le membrane perdono la loro resistenza meccanica, infatti nel tampone di reazione è stata rilevata la presenza di frammenti di membrana stessa.

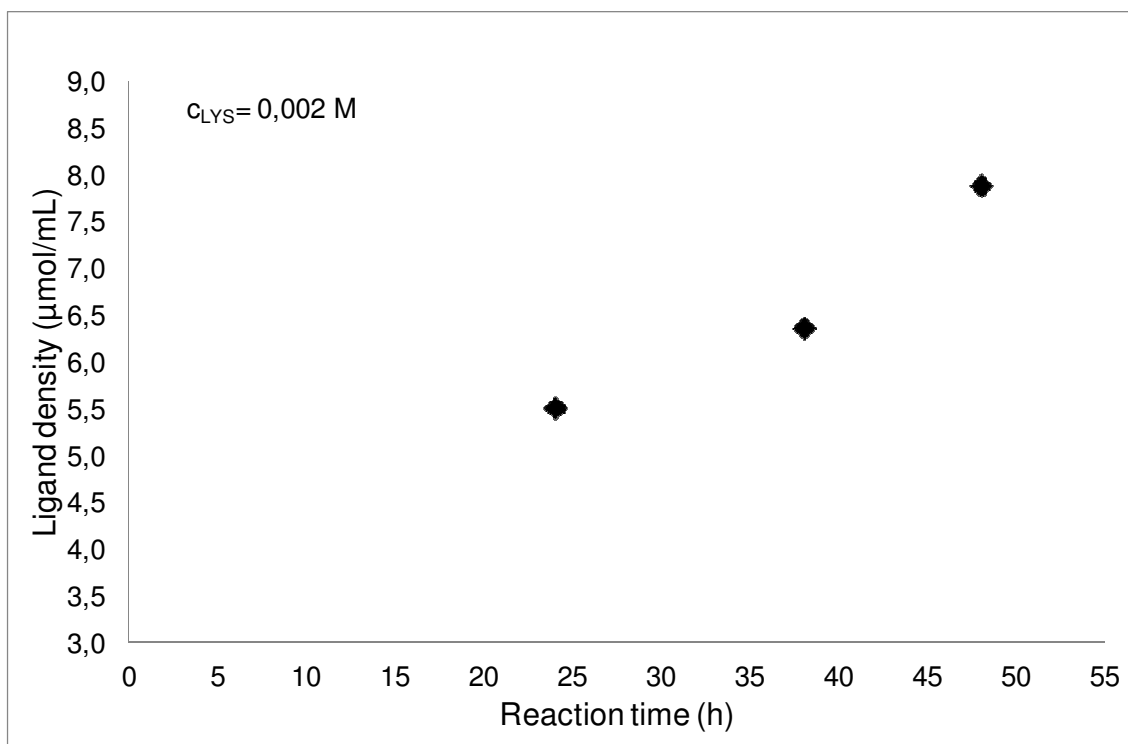


Figura 4.4 Densità di ligando in funzione del tempo di reazione alla concentrazione costante di L-lisina di 0.002 M.

Sulla base dei valori di densità di ligando ottenuti in funzione del tempo di reazione, si è ritenuto opportuno valutare la variazione della densità di ligando in funzione della concentrazione di L-lisina nella soluzione di partenza, in corrispondenza di una durata di reazione pari a 48 h, variando la concentrazione da $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ a 0.5 M , come già descritto in Tabella 4.2.

Dal grafico, riportato in Figura 4.5, si osserva che all'aumentare della concentrazione di lisina in soluzione, la densità di ligando immobilizzato aumenta fino a raggiungere una situazione di equilibrio in corrispondenza di un valore di concentrazione pari a 0.5 M, valore oltre il quale la densità di ligando tende a rimanere costante.

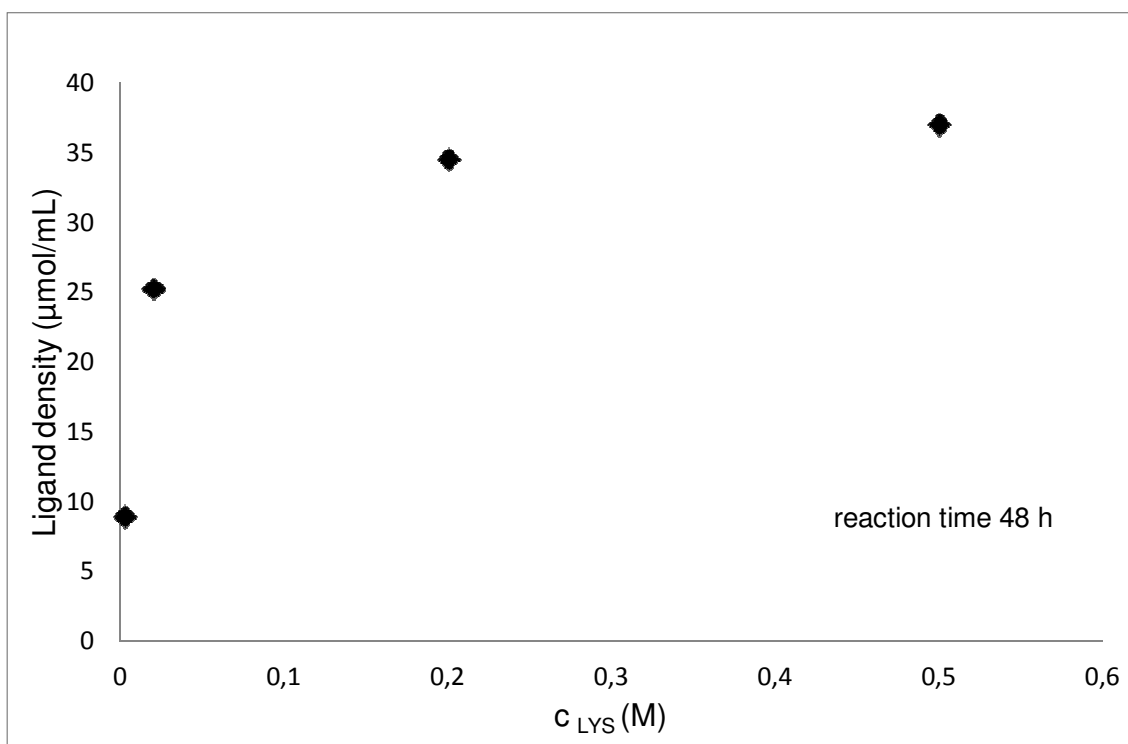


Figura 4.5 Densità di ligando in funzione della concentrazione di L-lisina in soluzione con tempo di reazione costante pari a 48 h.

In conclusione, l'immobilizzazione della L-lisina sulle membrane Sartobind Epoxy® modificate secondo il Protocollo I, raggiunge il miglior risultato in corrispondenza di una durata della reazione di immobilizzazione pari a 48 h, con una concentrazione di L-lisina in soluzione di 0.5 M; tali condizioni

permettono di ottenere membrane di affinità con una densità di ligando pari a $37.06 \pm 2.79 \mu\text{mol/mL}$.

In queste condizioni la resa dell'immobilizzazione, valutata come percentuale di siti attivi della membrana utilizzati dal ligando per l'immobilizzazione, risulta compresa fra il 38.7% e il 41.6%.

4.5 Caratterizzazione dinamica delle membrane con siero umano

Le membrane Sartobind Epoxy® modificate seguendo il Protocollo I, che hanno presentato la miglior efficienza nel processo di immobilizzazione, raggiungendo una densità di ligando pari a $37.06 \pm 2.79 \mu\text{mol/mL}$, sono state caratterizzate in prove dinamiche al fine di valutarne le prestazioni durante il processo cromatografico per la purificazione del plasminogeno da siero umano.

Il processo cromatografico è stato condotto alloggiando le membrane in uno specifico modulo, descritto in Appendice A.3, che consente di utilizzare più membrane sovrapposte formando così una colonna cromatografica. Tale modulo è stato progettato, costruito e ottimizzato allo scopo nei laboratori del DICAM [60-63].

Si tratta di un modulo costruito in acciaio inox, materiale che, oltre a impedire l'adsorbimento non specifico delle biomolecole, garantisce resistenza meccanica a pressioni elevate, consentendo di eseguire prove cromatografiche con un alto numero di membrane e ad elevate portate.

Questo modulo è strutturato in modo tale da sfruttare il principale vantaggio della cromatografia con membrane, ovvero la predominanza del trasporto di materia per convezione, grazie al quale il processo di separazione risulta più rapido. Affinché questo beneficio venga sfruttato al massimo le membrane

vengono compresse adeguatamente in modo che il flusso risulti distribuito uniformemente attraverso il supporto e che siano assenti zone inutilizzate.

Per un corretto utilizzo dell'area attiva delle membrane, il fluido in ingresso attraversa tutti i punti della superficie della prima membrana nello stesso istante e scorre uniformemente all'interno del supporto. Inoltre, la soluzione in uscita dall'ultima membrana viene raccolta omogeneamente.

4.5.1 Condizioni operative

Nel modulo sono state alloggiate 5 membrane modificate, aventi diametro di 2.6 cm, corrispondente al diametro del modulo stesso, aventi un volume complessivo di 0.44 mL. La compressione percentuale ottimale pari circa al 13% è stata raggiunta inserendo un opportuno distanziale dello spessore di 3,8 mm.

Le condizioni operative per la realizzazione della fase di adsorbimento con queste membrane nelle prove preliminari, sono state decise sulla base di alcune considerazioni sul meccanismo di reazione che permette l'adsorbimento del plasminogeno da parte della L-lisina.

Il plasminogeno si lega in modo specifico alla L-lisina, oltre che per mezzo del suo gruppo α -carbossilico, anche tramite il gruppo ϵ -amminico proprio come avviene per l'acido arancio 7. Pertanto si è deciso di operare, durante la fase di adsorbimento, in modo analogo a quanto fatto per il saggio colorimetrico, descritto nel Paragrafo 3.2.1.

Quindi, poiché la reazione tra il colorante e la lisina raggiunge l'equilibrio dopo 24 h, si è pensato di realizzare la fase di adsorbimento in condizioni di ricircolo

per 24 h con l'ausilio di una pompa peristaltica (Figura 4.6) alla portata di 0.5 mL/min.

Durante l'adsorbimento si è lasciato ricircolare siero umano, gentilmente concesso dalla Banca del sangue dell'ospedale di Reggio Emilia, diluito 1:2 in tampone fosfato 50 mM, per un volume complessivo di 15 mL.

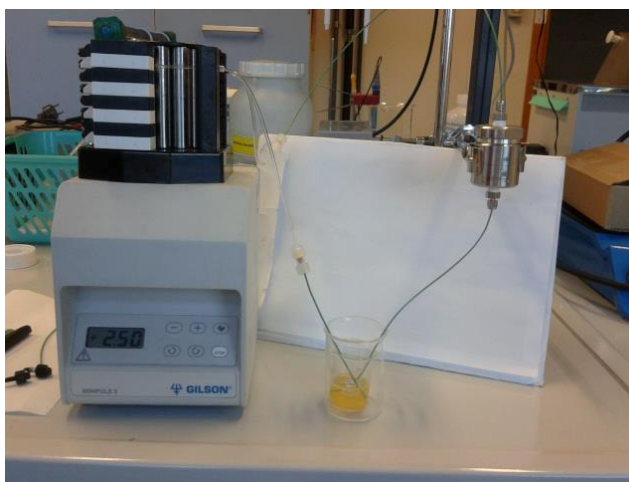


Figura 4.6 Fase di adsorbimento in ricircolo.

Terminato l'adsorbimento, il modulo a membrane è stato inserito nel sistema FPLC, in modo che le successive fasi di lavaggio ed eluizione potessero essere monitorate in continuo alla portata di 2 mL/min.

I tamponi utilizzati per le fasi di equilibrizzazione, lavaggio ed eluizione, riportati in Tabella 4.3, vengono indicati dalla GE per la realizzazione della cromatografia di affinità con la resina Lysine Sepharose™ 4B [64].

Tabella 4.3 Tamponi utilizzati per la cromatografia di affinità.

Fasi della cromatografia	Tampone
Equilibratura	50 mM tampone fosfato, pH 7.5
Adsorbimento	Siero umano diluito 1:2 in tampone fosfato
Lavaggio 1	Tampone fosfato 50 mM, pH 7.5
Lavaggio 2	Tampone fosfato 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.5
Eluizione	Acido amminocaproico 0.2 M in acqua distillata

Si noti che il protocollo suggerito dalla GE prevede due fasi di lavaggio: la prima con il solo tampone fosfato 50 mM per rimuovere le molecole legate in modo non specifico o bloccate nel supporto e la seconda con lo stesso tampone arricchito di NaCl 0.5 M per garantire la rimozione di eventuali molecole legate al supporto con interazioni di tipo ionico.

La prova con adsorbimento in condizioni di ricircolo è stata seguita da una prova in continuo con l'FPLC ÄKTA Purifier senza ricircolo utilizzando un nuovo set di 5 membrane. Anche in questo caso le condizioni operative applicate ad ogni fase cromatografica sono state le stesse della prova precedente: stessa quantità di siero alimentato, stessi tamponi e stesse portate.

4.6 Risultati della caratterizzazione dinamica

Le fasi cromatografiche realizzate con il sistema FPLC ÄKTA Purifier 100 sono state monitorate in continuo con il software Unicorn™ connesso all'FPLC. Il

software, oltre a registrare i valori istantanei di conducibilità e di pH della soluzione che attraversa l'impianto dell'FPLC, permette di seguire l'andamento del segnale UV a 280 nm e della pressione, al variare del volume di soluzione alimentata o, analogamente al variare del tempo di transito della soluzione.

Come descritto in precedenza, per la prova realizzata in condizione di ricircolo in adsorbimento è stato registrato esclusivamente il cromatogramma relativo alle fasi di lavaggio ed eluizione. La Figura 4.7 mostra l'andamento del segnale UV in funzione del volume di soluzione alimentata. Si osserva che per riportare il segnale UV a valori vicini alla linea di base è stato necessario alimentare complessivamente circa 60 mL di tampone di lavaggio (30 mL di tampone fosfato e 30 mL di tampone fosfato e NaCl), a cui corrisponde una durata della fase di lavaggio di circa 30 minuti.

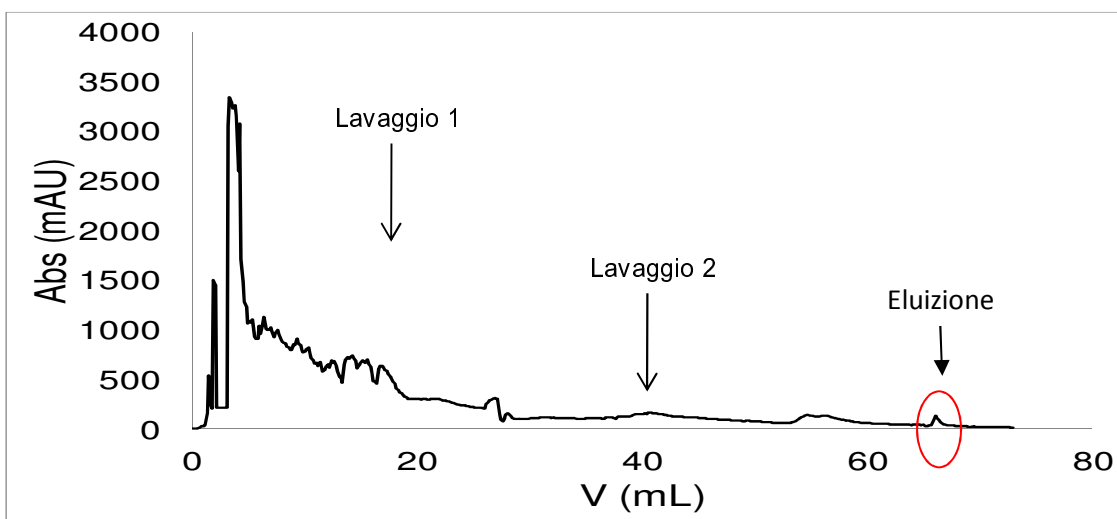


Figura 4.7 Cromatogramma delle fasi di lavaggio ed eluizione della prova con adsorbimento in ricircolo.

Il cromatogramma evidenzia un picco poco pronunciato, ma ben definito in corrispondenza della fase di eluizione, inoltre si osserva che questa fase ha richiesto circa 10 mL di eluente prima che il segnale UV ritornasse ad assumere un valore di assorbanza vicino alla linea di base.

I campioni raccolti in ogni fase cromatografica sono stati sottoposti ad elettroforesi SDS-PAGE, al fine di individuare le proteine presenti (Figura 4.8).

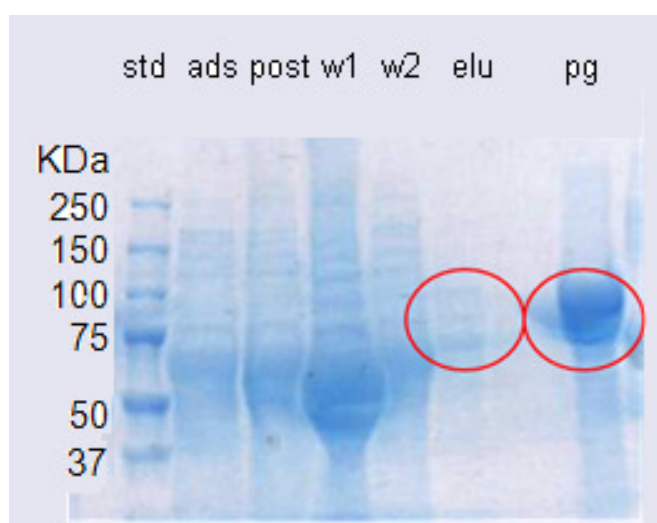


Figura 4.8 Elettroforesi SDS-PAGE della prova con ricircolo in adsorbimento.

Nella prima corsia del gel in poliacrilammide, indicata con “std”, è stato introdotto il marker Biorad usato come standard di riferimento in cui si distinguono le bande corrispondenti ai pesi molecolari: 250, 150, 100, 75, 50 e 37 kDa. Nella seconda corsia, denominata “ads”, è stato introdotto il siero umano diluito 1:80 in tampone fosfato, diluizione necessaria a causa della presenza di molteplici proteine nel fluido biologico. A questa corsia segue quella del post-adsorbimento “post”, che riporta il campione diluito 1:80, raccolto dopo l’adsorbimento da parte delle membrane. Come si nota la corsia “ads” e la

corsia “post” risultano perfettamente confrontabili, indice del fatto che la maggior parte delle proteine attraversa le membrane senza reagire in modo specifico o aspecifico con le stesse.

Seguono le corsie dedicate ai due lavaggi: “w1” e “w2”. In questo caso i campioni non sono stati diluiti al fine di analizzarli tali e quali. Si noti che il primo lavaggio riesce a rimuovere dalle membrane la maggior parte delle proteine che non hanno interagito in modo specifico con il ligando, in particolare è evidente una banda piuttosto intensa e ampia compresa fra i pesi molecolari 50 e 75 kDa, corrispondente all’albumina che costituisce il 60% delle proteine plasmatiche. Il secondo lavaggio si limita a rimuovere un residuo di proteine ancora presente nelle membrane.

Quindi è la volta della corsia dedicata al campione eluito, indicata con il nome “elu”, che viene direttamente confrontato con il plasminogeno acquistato da Sigma Aldrich, utilizzato come riferimento, introdotto nell’ultima corsia.

Si osserva che la banda caratteristica del plasminogeno, compresa fra i 75 e i 100 kDa, è presente anche nell’eluato. È evidente che la banda presente nell’eluato è meno intensa rispetto a quella del plasminogeno a causa della sua bassa concentrazione. Infatti, da considerazioni sulla quantità di siero alimentata e sulla quantità di proteina eluita si ricava che il plasminogeno presente nel campione eluito potrebbe avere al massimo una concentrazione di 0.15 mg/mL, valore che rappresenta solo il 30% della concentrazione del plasminogeno di riferimento avente una concentrazione di circa 0.5 mg/mL.

Alla luce dei risultati appena descritti è possibile affermare che le membrane Sartobind Epoxy®, modificate secondo il Protocollo I, sono capaci di isolare il plasminogeno attraverso un processo cromatografico che prevede una fase di adsorbimento in condizioni di ricircolo.

Purtroppo, risultati analoghi non sono stati ottenuti sottoponendo un nuovo set di membrane, preparate nello stesso modo, ad un processo realizzato in

continuo e senza ricircolo in adsorbimento. Infatti, in questo caso il cromatogramma non ha evidenziato alcun picco nella fase di eluizione.

4.7 Criticità del Protocollo I

Il Protocollo I, utilizzato per la modifica delle membrane Sartobind Epoxy® presenta varie limitazioni connesse a diversi aspetti.

Il primo elemento di criticità del protocollo è rappresentato dal fatto che utilizzi, come tampone di reazione, un solvente organico, quale il diossano, per cui non possono essere trascurati eventuali problemi connessi alla sua tossicità.

A questo si aggiunge il fatto che la presenza del plasminogeno nell'eluato si ottiene esclusivamente applicando un ricircolo nella fase di adsorbimento.

Un sistema costituito da membrane modificate in queste condizioni è sicuramente inadeguato per l'applicazione biomedica prevista.

Inoltre, al secondo utilizzo delle membrane, in condizioni di ricircolo in adsorbimento, non è stata riscontrata nessuna traccia di plasminogeno eluito.

Lo studio del rilascio di ligando, ottenuto sottoponendo le membrane utilizzate al saggio colorimetrico in presenza di acido arancio 7, ha evidenziato un rilascio di ligando, dopo circa 15 minuti in NaOH, pari al 71.5% del totale immobilizzato. Questo risultato suggerisce una scarsa stabilità del legame fra i gruppi epossidici delle membrane e la L-lisina.

Alla luce di queste considerazioni si reso necessario ricercare e sperimentare un protocollo alternativo capace di superare le criticità appena descritte associate al Protocollo I.

CAPITOLO 5

Preparazione e caratterizzazione delle membrane di affinità: PROTOCOLLO II

I risultati ottenuti modificando le membrane Sartobind Epoxy® in accordo con il Protocollo I, sono diventati il riferimento rispetto a cui sperimentare ed ottimizzare un protocollo alternativo, chiamato Protocollo II, descritto di seguito. Analogamente a quanto fatto per il Protocollo I, è stata studiata l'efficienza dell'immobilizzazione in funzione dei parametri operativi al fine di stabilire le condizioni ottimali di modifica delle membrane.

Le membrane modificate in queste condizioni sono state caratterizzate con siero bovino e siero umano.

5.1 Protocollo II

La procedura alternativa di immobilizzazione della L-lisina sulle membrane Sartobind Epoxy®, è stata eseguita partendo da un protocollo utilizzato per

immobilizzare lisina su resina in silice ad attivazione epossidica per cromatografia di affinità [59].

Seguendo questo protocollo le membrane, preparate in dischi del diametro di 2.6 cm, vengono bagnate in una soluzione composta da tampone fosfato 100 mM a pH 8. Le membrane così equilibrate vengono introdotte in una soluzione costituita dallo stesso tampone contenente L-lisina, quindi vengono tenute in agitazione in un bagno termostatico alla temperatura di 50°C.

Terminata la fase di immobilizzazione, le membrane sono lavate con tampone fosfato per rimuovere l'eccesso di L-lisina non immobilizzata e incubate in tampone fosfato contenente etanolamina 1 M a pH 9.5 per 24 h alla temperatura di 4°C, al fine di bloccare ogni sito attivo delle membrane non occupato. Infine, le membrane vengono lavate una volta con tampone fosfato, 4 volte con 1 M NaCl in acqua demineralizzata e filtrata, e infine ancora una volta con tampone fosfato.

Il protocollo non prevede l'asciugatura delle membrane, che vengono conservate in frigorifero nel tampone fosfato 100 mM a pH 8.

In tabella sono messe a confronto le fasi di modifica del Protocollo I e del Protocollo II.

Dalla Tabella 5.1 si evince che, analogamente a quanto già descritto nel caso del Protocollo I, anche in questo caso sono stati variati i parametri: durata dell'immobilizzazione e concentrazione di L-lisina in soluzione al fine di individuare le condizioni ottimali di modifica delle membrane.

Tabella 5.1 Confronto fra i due protocolli.

	IMMOBILIZZAZIONE					INCUBAZIONE				LAVAGGIO	ASCIUGATURA
I PROTOCOLLO	Tampone di reazione	pH	T (°C)	Durata	Lisina (M)	Tampone	pH	T (°C)	Durata (h)	Acqua Isopropanolo Esano	T = 50°C per 15min
	Sol. Acquosa L-lisina/ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / NaOH/ 1.4-Diossano	10	80	48 h	0.5	/	/	/	/		
PROTOCOLLO II	L-lisina/Tamp. fosfato	8	50	3 gg 5 gg 7 gg	0.5 0.5, 1, 2.5, 5 0.5	Tamp. fosfato/ Etanolamina	9.5	4	24	Tampone fosfato/ NaCl	/

5.1.1 Studio dell'efficienza dell'immobilizzazione

L'efficienza dell'immobilizzazione è stata studiata in funzione della durata della reazione tra la L-lisina e i gruppi epossidici della membrana, mantenendo costante a 0.5 M il valore di concentrazione di L-lisina nella soluzione di partenza.

Dal grafico riportato in Figura 5.1, si osserva che all'aumentare del tempo da 3 a 5 giorni è associato un incremento della densità di ligando che non risulta essere particolarmente significativo. Infatti la densità di ligando raggiunge dopo 7 giorni solo un incremento del 7% rispetto al valore che si ottiene in corrispondenza di 3 giorni di reazione.

Tuttavia, durante la misura della densità di ligando, con acido arancio 7, si è osservato che il desorbimento del colorante dalle membrane ad opera del NaOH, avviene in circa 30 minuti per la modifica realizzata in 3 giorni e in circa 2 h per le altre durate.

Questo comportamento suggerisce che la reazione tra gruppi epossidici e la L-lisina, pur avvenendo entro i primi 3 giorni, risulta essere stabile solo dopo 5 giorni. Quindi, per non incorrere nel problema di rilascio di ligando riscontrato applicando il Protocollo I, è necessario effettuare un'immobilizzazione per almeno 5 giorni.

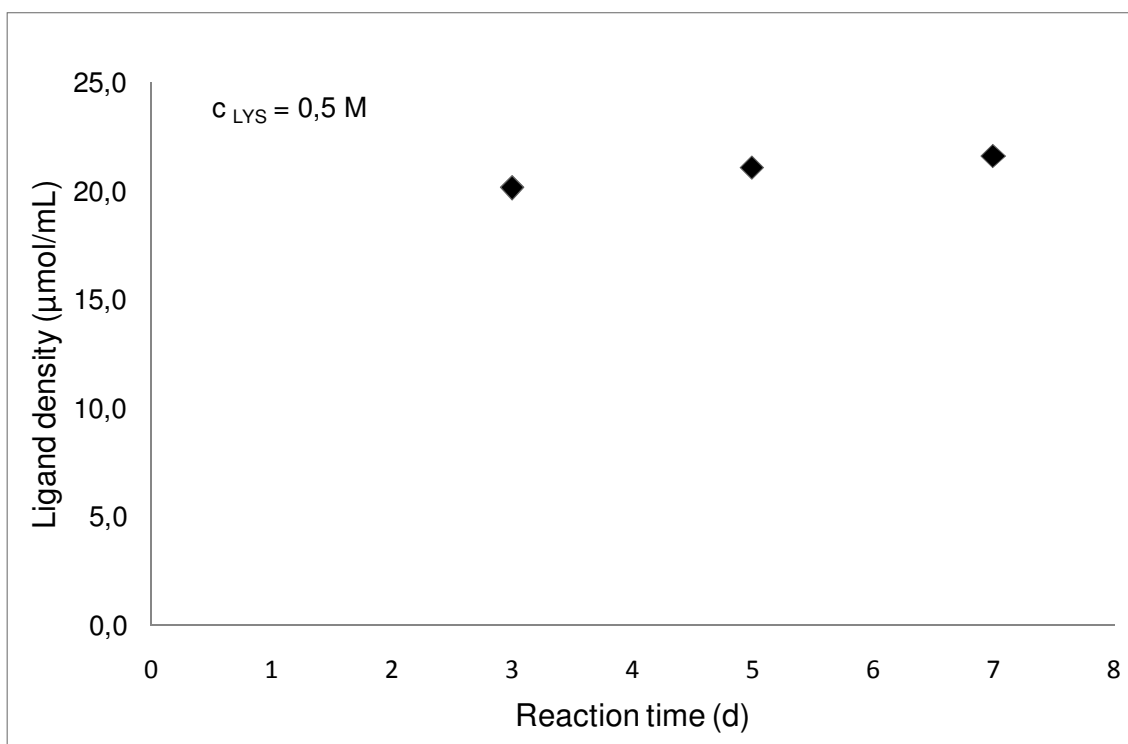


Figura 5.1 Densità di ligando in funzione della durata di reazione con concentrazione costante di L-lisina pari a 0.5 M.

Un andamento diverso da quello appena descritto si ottiene dallo studio dell'efficienza dell'immobilizzazione condotto in funzione della concentrazione di L-lisina nella soluzione di partenza, mantenendo costante e pari a 5 giorni la durata della reazione. In particolare, come riportato in Tabella 5.1, la concentrazione di L-lisina in soluzione è stata variata da 0.5 a 5 M. Il grafico

riportato in Figura 5.2 mostra che la densità di ligando aumenta con la concentrazione di L-lisina nella soluzione di partenza raggiungendo, in corrispondenza della concentrazione di 5 M, un incremento pari a circa il 40% del valore misurato in corrispondenza di 0.5 M.

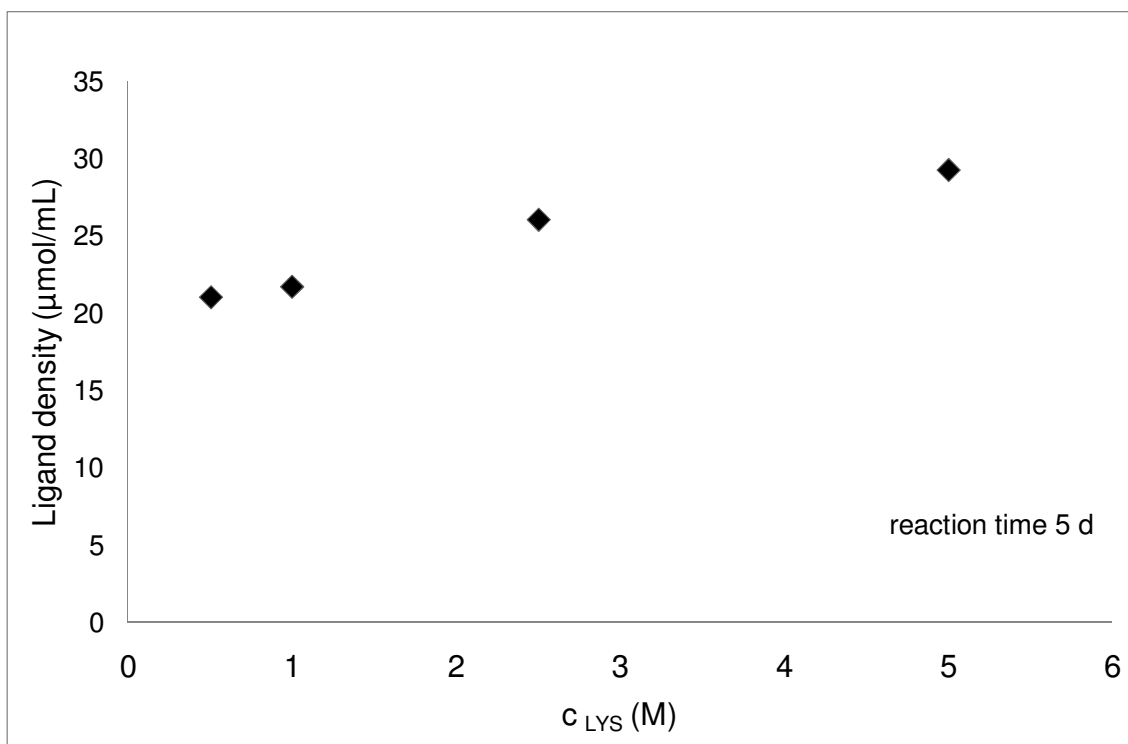


Figura 5.2 Densità di ligando in funzione della concentrazione di L-lisina per una durata di reazione pari a 5 giorni.

I risultati ottenuti dallo studio della reazione di immobilizzazione suggeriscono che la migliore resa di immobilizzazione si avrebbe in corrispondenza di una durata della reazione pari a 7 giorni e una concentrazione di L-lisina nella soluzione di partenza di 5 M, ma in questo caso il processo di modifica risulterebbe particolarmente costoso. Infatti, in queste condizioni la modifica di 5

membrane, necessarie per realizzare un ciclo cromatografico, avrebbe un costo del 70% superiore rispetto a quello che si avrebbe per modificare lo stesso numero di membrane con 2.5 M di L-lisina per 5 giorni. Si precisa che la valutazione del costo di modifica tiene conto del costo dei materiali utilizzati e delle spese associate al consumo energetico.

In conclusione, valutando i costi del processo di modifica rispetto alla densità di ligando immobilizzato, si è deciso di caratterizzare le membrane preparate in 5 giorni con una concentrazione di L-lisina in soluzione di 2.5 M. La densità di ligando raggiunta in queste condizioni è di $26.00 \pm 0.48 \mu\text{mol/mL}$, cui corrisponde una resa di immobilizzazione del 30%, resa inferiore del 10% rispetto a quella ottenuta con il Protocollo I.

5.2 Caratterizzazione dinamica delle membrane con siero bovino

Le membrane Sartobind Epoxy®, modificate in accordo con il Protocollo II, sono state caratterizzate in condizioni dinamiche, utilizzando nella fase preliminare della sperimentazione siero bovino diluito 1:2. In questa fase si è ritenuto opportuno far uso del siero bovino poiché, pur presentando caratteristiche analoghe al siero umano dal punto di vista della composizione proteica, risulta essere molto più economico.

Analogamente a quanto effettuato per la caratterizzazione delle membrane modificate in accordo con il Protocollo I, sono state utilizzate 5 membrane sovrapposte aventi volume complessivo di 0.44 mL. Tutte le fasi cromatografiche sono state realizzate in condizioni dinamiche montando il modulo a membrane nel circuito dell'FPLC.

Le condizioni operative applicate, riportate in Tabella 5.2, sono indicate per la realizzazione del medesimo processo cromatografico con resina epossidica [59].

Tabella 5.2 Condizioni operative.

Fasi della cromatografia	Protocollo II
Equilibratura	Tampone fosfato di sodio 100 mM, pH 8
Adsorbimento	Siero bovino diluito 1:2 in tampone fosfato
Lavaggio	Tampone fosfato di sodio 100 mM, pH 8
Eluizione	Acido aminocaproico 15 mM in tampone fosfato

Dalla Tabella 5.2 si nota che le membrane vengono equilibrate con lo stesso tampone fosfato usato per la modifica; inoltre, a differenza di quanto previsto dalle condizioni operative applicate al processo cromatografico con le membrane modificate in accordo con il Protocollo I, si opera il lavaggio con lo stesso tampone di equilibratura e si realizza l'eluizione con acido aminocaproico in tampone fosfato alla concentrazione di 15 mM.

5.2.1 Prove A

Il primo set di prove, identificato con la lettera A, è stato realizzato alimentando 10 mL di siero bovino diluito 1:2 in tampone fosfato 100 mM alla portata di 0.5 mL/min. Le fasi di lavaggio ed eluizione sono state condotte alla portata di 1 mL/min. Un cromatogramma caratteristico è riportato in Figura 5.3.

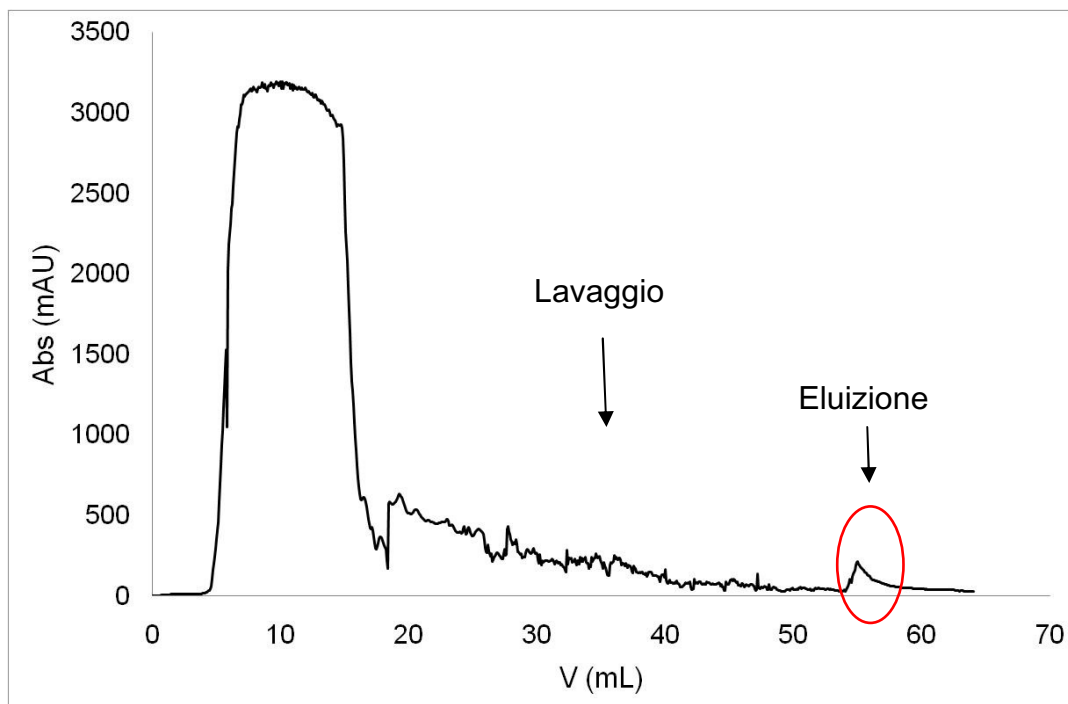


Figura 5.3 Processo cromatografico realizzato alimentando 10 mL di siero bovino diluito 1:2.

Dal cromatogramma si evince che il lavaggio delle membrane, necessario per rimuovere le proteine legate in modo aspecifico, richiede un volume di circa 30 mL prima che il segnale UV, in corrispondenza della lunghezza d'onda a 280 nm, raggiunga la linea di base. L'eluizione, realizzata con 10 mL di acido aminocaproico, è caratterizzata dalla presenza di un picco ben definito in eluizione .

5.2.2 Prove B

Un secondo set di prove, identificato con la lettera B, è stato eseguito nelle stesse condizioni delle Prove A, ad eccezione della fase di adsorbimento che è

stata realizzata alimentando 20 mL di siero bovino diluito 1:2 in tampone fosfato.

Come prevedibile, a causa del volume di alimentazione superiore rispetto a quello utilizzato nelle Prove A, nelle Prove B la fase di lavaggio necessita di circa 40 mL di tampone per azzerare il segnale UV, mentre la fase di eluizione viene completata sempre con 10 mL di soluzione contenente acido amminocaproico. Anche in questo caso, si registra la presenza di un picco in eluizione, come evidenziato da un cromatogramma caratteristico in Figura 5.4.

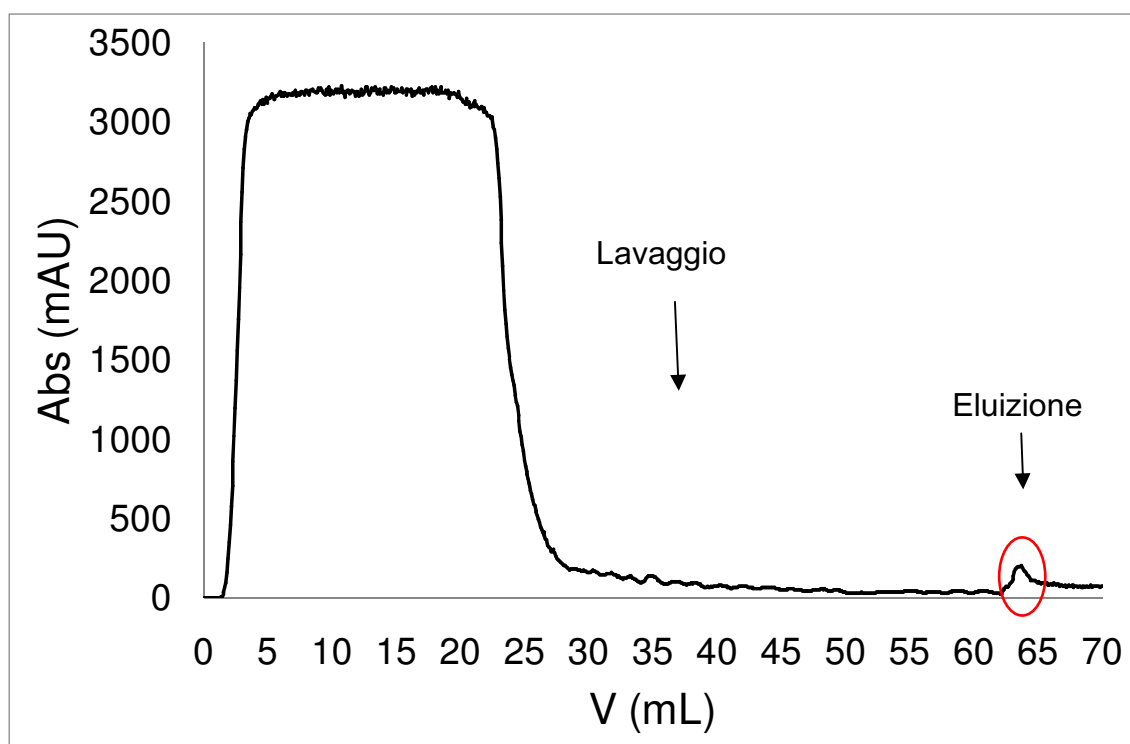


Figura 5.4 Processo cromatografico realizzato alimentando 20 mL di siero bovino diluito 1:2.

5.2.3 Risultati della caratterizzazione dinamica

Gli eluati ottenuti con le Prove A e con le Prove B sono stati raccolti in frazioni da 1 mL per evitare che le proteine in essi contenute risultassero troppo diluite. I campioni raccolti in corrispondenza del picco sono stati sottoposti ad elettroforesi, al fine di individuare le proteine presenti.

Nella prima corsia del gel per elettroforesi, riportato in Figura 5.5, è stato introdotto il siero bovino diluito 1:80 con tampone fosfato; nelle corsie successive si distinguono i campioni degli eluati relativi alla Prova B e alla Prova A, di cui sono stati riportati i cromatogrammi nelle Figure 5.3 e 5.4, separati dalla corsia contenente il plasminogeno usato come riferimento; nell'ultima corsia si trova il marker.

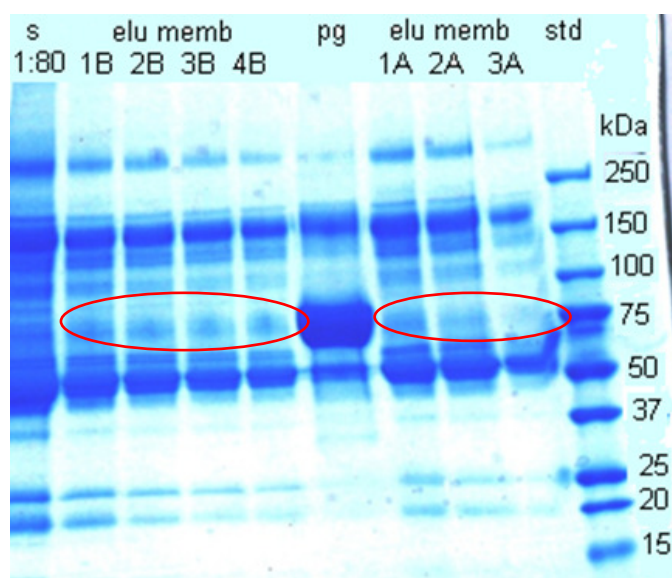


Figura 5.5 Elettroforesi degli eluati delle prove con siero bovino.

L'elettroforesi dimostra in maniera indiscutibile la presenza di plasminogeno nei campioni raccolti dalle eluizioni provenienti dalle due prove, infatti sono evidenti

in tutti campioni le bande corrispondenti alla banda del plasminogeno con peso molecolare compreso fra 75 e 100 kDa. Oltre alla tipica banda del plasminogeno, si riconoscono tutte le altre bande presenti nel campione di plasminogeno puro: una banda approssimativamente corrispondente al peso molecolare di 50 kDa, probabilmente riferita alla catena pesante della plasmina già convertita e una banda ulteriore, corrispondente ad un peso molecolare approssimativo di 250 kDa che Hermel riferisce alla presenza di una apolipoproteina [4].

5.3 Validità del Protocollo II

Dai risultati della caratterizzazione dinamica delle membrane modificate in accordo con il Protocollo II, è evidente che, nonostante queste membrane presentino una densità di ligando inferiore del 10% rispetto a quella raggiunta applicando il Protocollo I, siano in grado di separare in modo molto più significativo il plasminogeno dal siero.

Ogni ciclo cromatografico nelle condizioni delle Prove A e delle Prove B è stato ripetuto con nuovi set di membrane, ottenendo, ogni volta, comportamenti e risultati analoghi a quelli descritti nel paragrafo precedente.

In questo modo è stata verificata la riproducibilità dei risultati ed è stata accerta la validità del processo di modifica eseguito sulle membrane Sartobind Epoxy® in accordo con il Protocollo II, verificando l'efficienza delle membrane nella separazione del plasminogeno dal siero bovino.

Infatti la quantità di plasminogeno eluito durante le prove di tipo A, calcolata con il metodo descritto nel Paragrafo 3.2, è in media circa 1.1 mg, ovvero solo il 10% superiore rispetto al valore teorico di plasminogeno contenuto nel siero

alimentato. Un risultato dello stesso tipo si ottiene con le prove di tipo B, infatti il plasminogeno eluito risulta essere in media 1.9 mg, valore perfettamente confrontabile con 2 mg, valore teorico di plasminogeno contenuto nel siero alimentato.

Sottoponendo lo stesso set di membrane a due cicli cromatografici successivi, è stato osservato che contrariamente a quanto accade alle membrane modificate con il protocollo I, che rilasciano ben il 71.5% di ligando, le membrane modificate con il Protocollo II rilasciano solo 17% di ligando. Questo risultato conferma la stabilità del legame che si instaura fra la L-lisina e i gruppi epossidici delle membrane modificate con il Protocollo II, giustificando le migliori prestazioni nell'isolamento del plasminogeno.

5.4 Caratterizzazione dinamica con siero umano

Ricordando che in questa attività di ricerca si vogliono utilizzare le membrane di affinità per applicazioni oftalmologiche, si è reso indispensabile sperimentare le membrane modificate attraverso il Protocollo II per isolare il plasminogeno dal siero umano.

Per questo motivo un nuovo set composto da 5 membrane di affinità è stato sottoposto a caratterizzazione dinamica con siero umano, applicando le stesse condizioni operative utilizzate nelle prove di tipo B realizzate con siero bovino. Pertanto 20 mL di siero umano diluito 1:2 con tampone fosfato sono stati alimentati alla portata di 0.5 mL/min.

Come si evince dal cromatogramma riportato in Figura 5.6, la fase di lavaggio delle membrane, condotta alla portata di 1 mL/min, ha richiesto un volume di tampone fosfato di circa 60 mL prima che il segnale UV raggiungesse

nuovamente la linea di base. Si osserva che sono stati utilizzati circa 20 mL di soluzione in più rispetto a quelli necessari per il lavaggio nell'analoga prova con siero bovino. Questo risultato non deve sorprendere considerando la diversa origine del siero utilizzato.

Anche in questo caso l'eluizione, realizzata alla usuale portata di 1 mL/min e con un volume di 10 mL di acido amminocaproico in tampone fosfato, mostra la presenza di un picco.

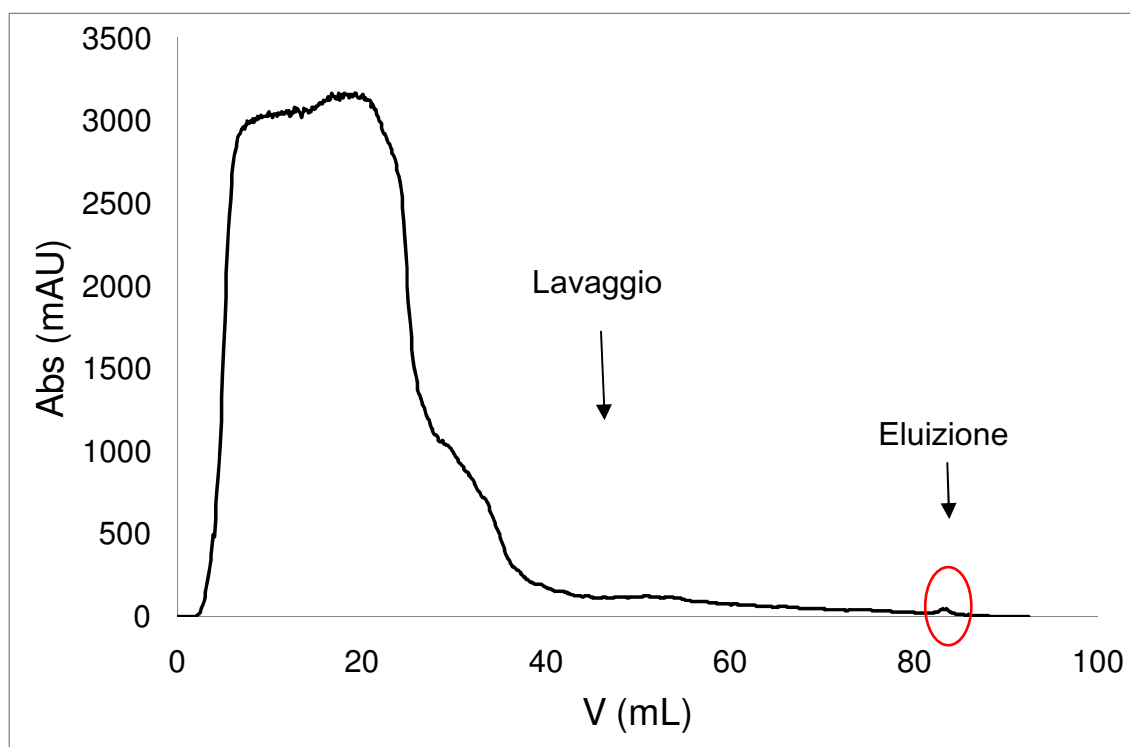


Figura 5.6 Processo cromatografico realizzato alimentando 20 mL di siero umano diluito 1:2.

5.4.1 Risultati della caratterizzazione dinamica

Dalla Figura 5.6 è evidente che il picco di eluizione risulta meno pronunciato rispetto a quello ottenuto nell'analoga prova con siero bovino (Figura 5.4). In particolare, integrando le aree sottese dai due picchi di eluizione si è ottenuto un valore di 840.18 mAU·mL nella prova con siero bovino e un' area pari a 148.93 mAU·mL nella prova con siero umano.

Poiché l'area sottesa dalla curva associata al segnale UV a 280 nm, in funzione del volume di alimentazione, è indice della quantità di proteina presente in soluzione, si deduce che la proteina eluita dalle membrane caratterizzate con siero bovino è circa 6 volte superiore rispetto a quella eluita dalle membrane caratterizzate con siero umano.

Nonostante sia noto che sieri provenienti da lotti diversi, anche aventi la stessa origine, possano avere contenuti diversi e composizioni proteiche variabili, questo risultato è piuttosto inatteso, considerando le analoghe condizioni operative applicate per la realizzazione dei due processi cromatografici.

La risposta a tale discrepanza potrebbe risiedere nella diversa densità di ligando immobilizzato sulle membrane utilizzate nei due diversi processi.

Durante l'attività di ricerca è stata adottata la procedura di misurare la densità di ligando di una membrana campione ogni volta che un nuovo set di membrane veniva modificato per un'applicazione cromatografica, al fine di valutare la qualità del processo di immobilizzazione.

Grazie a questo tipo di misura è stato osservato che la densità di ligando immobilizzato sulle membrane usate per la prova con siero umano descritta, è inferiore del 12,5% rispetto al valore medio di 26.00 $\mu\text{mol/mL}$, pertanto la stessa prova è stata ripetuta con un nuovo set di membrane con una densità di ligando confrontabile con il valore medio di riferimento. La caratterizzazione di queste

membrane è avvenuta con siero umano proveniente dallo stesso lotto del siero usato nella prova precedente e nelle medesime condizioni.

Dal confronto fra i cromatogrammi associati alle due prove riportato in Figura 5.7, si nota che il picco presente nell'eluizione realizzata con il secondo set di membrane è più ampio e alla sua area, pari a 482.96 mAU·mL, corrisponde una quantità di proteina di circa 0.9 mg, valore che risulta essere circa il 50% inferiore rispetto a quello teoricamente contenuto nel siero alimentato.

Questo valore, pur essendo inferiore rispetto a quello ottenuto dall'eluizione con siero bovino, risulta comunque più consistente rispetto a quello ottenuto con il primo set di membrane.

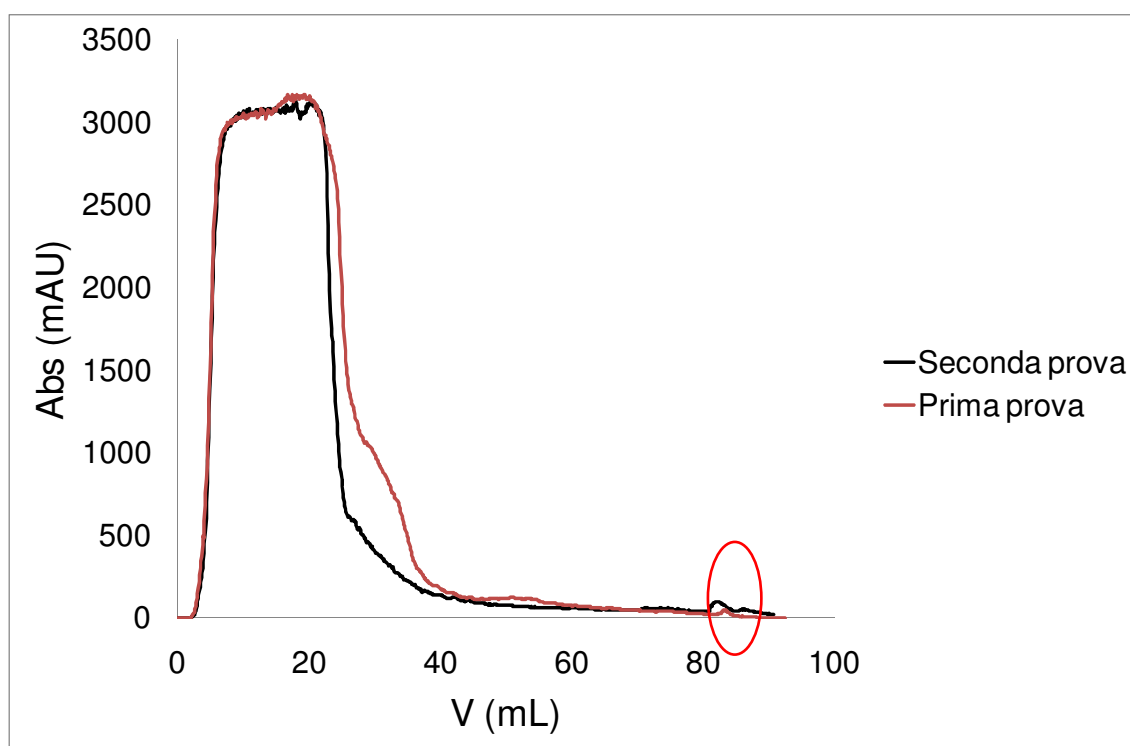


Figura 5.7 Confronto fra due processi cromatografici realizzati alimentando 20 mL di siero umano diluito 1:2.

I campioni eluiti dalla prima prova e dalla seconda prova sono stati raccolti in frazioni da 1 mL e le frazioni corrispondenti al picco di eluizione sono state sottoposte ad elettroforesi (Figura 5.8).

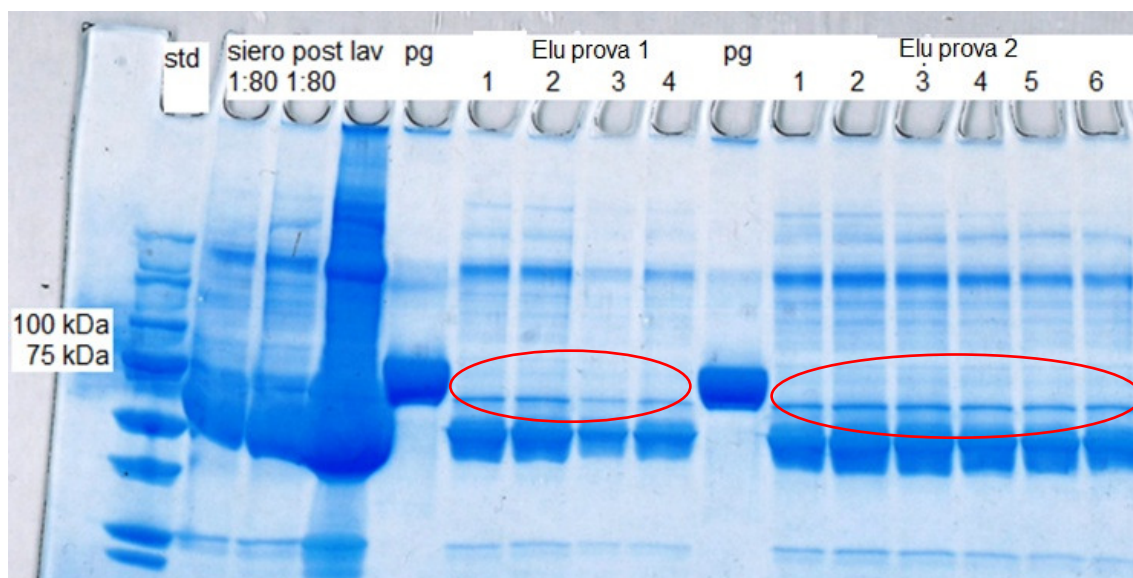


Figura 5.8 Elettroforesi delle prove con siero umano.

La prima corsia è stata dedicata ai Marker usati come standard di riferimento. Per completezza l'elettroforesi è stata eseguita anche sul siero umano diluito 1:80, come già fatto per il siero bovino, e sul siero proveniente dal post adsorbimento, diluito sempre 1:80 (corsia 2 e 3). Come già osservato nella caratterizzazione delle membrane con siero bovino, anche in questo caso la maggior parte delle proteine attraversa le membrane di affinità senza interagire, infatti le bande proteiche presenti nella corsia 2 e nella corsia 3 sono perfettamente confrontabili.

Come si evince dall'analisi, effettuata nella quarta corsia, del campione raccolto dal lavaggio tal quale, questa fase cromatografica è in grado di rimuovere una

grande quantità e varietà di proteine legate in modo non specifico alle membrane.

Nella quinta corsia è stato introdotto il plasminogeno “puro” usato come riferimento, quindi si trovano le corsie dedicate alle frazioni di eluato raccolte dalla prima prova. Come risulta evidente, in corrispondenza della banda caratteristica del plasminogeno, compresa fra i 75 e 100 kDa, anche l'eluato presenta una banda piuttosto intensa ed altre attigue meno intense.

Le corsie contenenti le frazioni di eluato raccolte nella prima prova sono separate dalle corsie contenenti le frazioni di eluato raccolte nella seconda prova da una corsia contenente il plasminogeno puro.

Le frazioni di eluato raccolte nella seconda prova presentano le stesse bande della prova precedente, ed in particolare, anche in questo caso, si riconosce la tipica banda del plasminogeno che risulta più intensa rispetto a quella evidenziata nella prima prova.

Confrontando le bande proteiche che compaiono nell'eluizione di queste prove con le analoghe ottenute dall'eluizione della prova con siero bovino (Figura 5.5), si osserva come le frazioni di eluizione risultino più pure, infatti le bande sono più risolte.

Questo risultato giustifica anche il fatto che la quantità di proteina eluita risulti essere inferiore rispetto a quella ottenuta con l'analogha prova effettuata con siero bovino. Infatti, tenendo presente che la quantità di proteina eluita è stata calcolata assumendo che tutta la proteina sia plasminogeno, si comprende che ad una maggiore purezza sia associato un valore più basso di proteina poiché si riduce il numero di proteine presenti nel campione eluito.

Le frazioni raccolte dall'eluizione sono state sottoposte anche ad analisi HPLC con colonna SEC. La Figura 5.9 confronta i cromatogrammi risultanti dalle analisi sui campioni eluiti con la prova realizzata con siero umano, in rosso, e l'analogha realizzata con siero bovino, in verde.

Si nota che i due profili cromatografici sono analoghi, indicando un analogo comportamento delle membrane nei confronti della separazione del plasminogeno da siero umano e da siero bovino.

È evidente che il valore dell'assorbanza registrato in corrispondenza dell'analisi del campione eluito durante il processo con siero umano è inferiore rispetto a quello registrato per il campione eluito durante il processo con siero bovino, e contemporaneamente risulta essere meno disturbato. Questi risultati confermano pienamente il comportamento già indicato dall'elettroforesi.

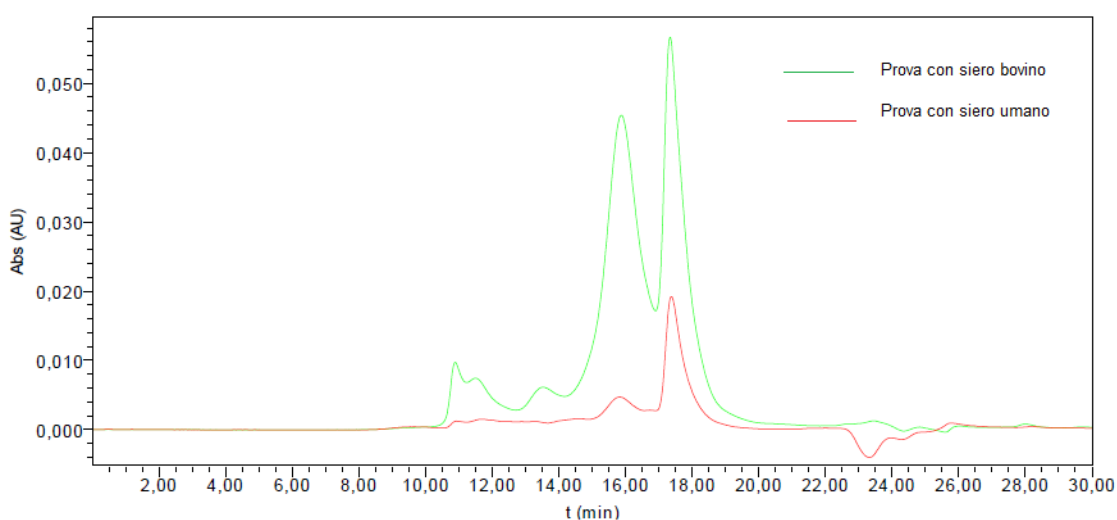


Figura 5.9 Confronto analisi SEC fra campioni eluiti durante la cromatografia con siero umano (rosso) e siero bovino (verde).

In definitiva è possibile affermare che la caratterizzazione dinamica con siero umano delle membrane Sartobind Epoxy®, modificate in accordo con il Protocollo II, dimostra la capacità di queste membrane, di separare il plasminogeno in modo selettivo.

5.5 Studio degli effetti dei parametri operativi

Fino a questo momento sono stati descritti i risultati raccolti dagli studi effettuati per definire l'efficacia del processo di separazione del plasminogeno da siero con membrane di affinità.

Accertata la validità del processo cromatografico realizzato con le membrane di affinità è stata rivolta l'attenzione allo studio degli effetti di alcuni parametri operativi sulle prestazioni del supporto.

5.5.1 Variazione del numero di membrane

Tutte le prove con membrane descritte nei capitoli precedenti sono state realizzate sempre con 5 membrane, avendo la possibilità di alloggiare nel modulo a membrane un numero variabile di membrane è stato realizzato un processo cromatografico raddoppiando la quantità di membrane nel modulo e variando opportunamente lo spessore dei distanziali (Figura 5.10).

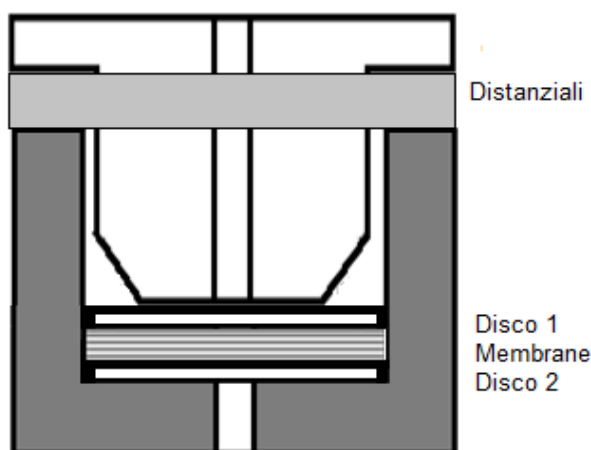


Figura 5.10 Rappresentazione schematica del modulo a membrane.

Pertanto 10 membrane modificate nel solito modo sono state utilizzate per un processo cromatografico alimentando 20 mL di siero bovino diluito 1:2 in tampone fosfato applicando le condizioni operative già descritte per le prove di tipo B.

Contrariamente alle attese, che prevedevano una quantità di proteina eluita superiore rispetto all'analoga prova con 5 membrane, avendo raddoppiato il numero di membrane e quindi dei siti disponibili per l'adsorbimento del plasminogeno, nella fase di eluizione non si è presentato alcun picco.

Questo risultato potrebbe essere spiegato ammettendo che le 10 membrane si comportino come un filtro che si intasa durante l'adsorbimento impedendo, in questo modo, la corretta esecuzione del processo cromatografico. Questa ipotesi è avvalorata da due osservazioni sperimentali: l'aumento della pressione in fase di adsorbimento registrata dal software Unicorn™ e dal fatto che aprendo la cella le prime tre membrane avessero assunto il tipico colore giallo del siero.

Pertanto si può concludere che il numero ottimale di membrane di affinità da utilizzare per la realizzazione del processo cromatografico con siero sia proprio 5.

5.5.2 Effetti della diluizione del siero

Per ridurre la probabilità dell'effetto filtro anche da parte di 5 membrane è stato investigato il comportamento delle membrane, aumentando la diluizione del siero alimentato.

Pertanto, al fine di alimentare la stessa quantità di proteina, 10 mL di siero sono stati diluiti 1:4 con tampone fosfato invece di 1:2, come accaduto per le prove di

tipo B. Il cromatogramma riportato in Figura 5.11 confronta i cromatogrammi delle due prove analoghe a meno della diluizione.

È evidente che il segnale in corrispondenza della fase di adsorbimento del siero con maggiore diluizione sia più basso a causa della concentrazione proteica più bassa.

Si nota che il lavaggio necessita in entrambi i casi della stessa quantità di tampone; inoltre nel caso della prova con siero diluito 1:4, si osserva che in eluizione non si presenta il tipico picco caratteristico della proteina eluita ma un picco poco definito con una coda piuttosto estesa, che niente ha in comune con quello che compare nella prova con siero diluito 1:2.

Ne deriva che aumentando la diluizione il tempo per la realizzazione del processo cromatografico aumenta di ben 40 minuti senza che le prestazioni delle membrane ne traggano beneficio.

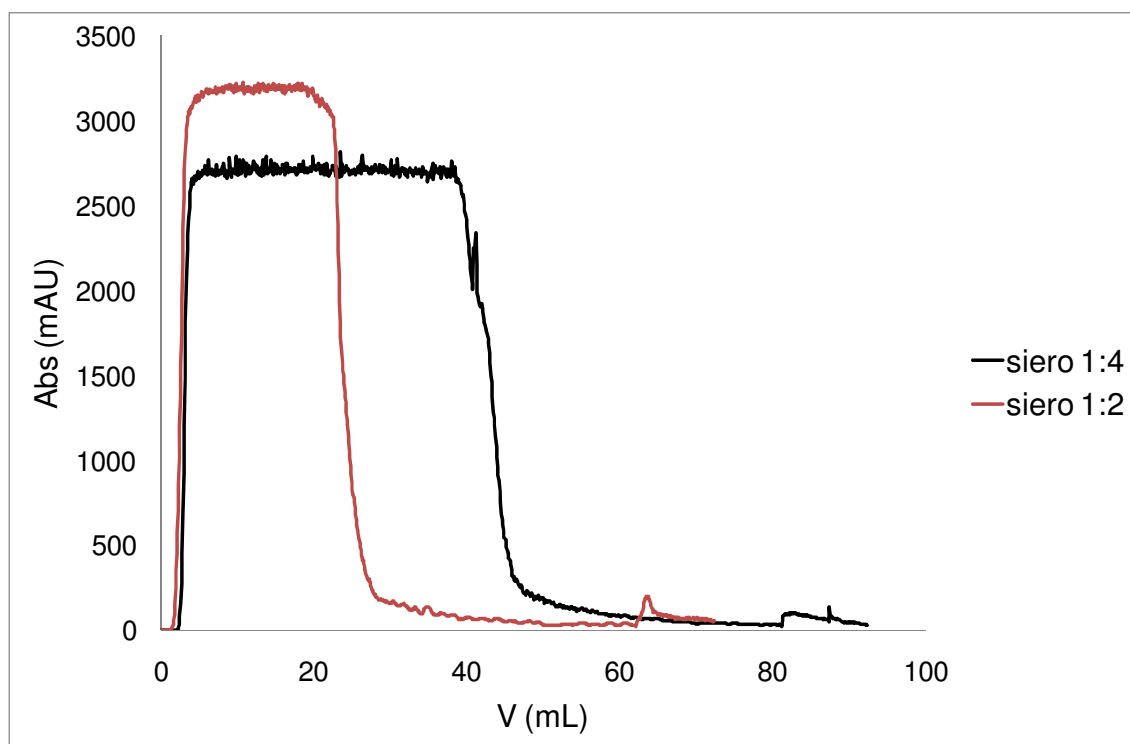


Figura 5.11 Confronto fra cromatogrammi di prove con siero diluito 1:2 e 1:4.

5.5.3 Ciclo cromatografico con doppio adsorbimento

Per favorire l'interazione del plasminogeno presente nel siero con il supporto, sono stati realizzati due adsorbimenti successivi dello stesso siero durante uno stesso ciclo cromatografico.

Pertanto 20 mL di siero bovino diluito 1:2 con tampone fosfato sono stati alimentati nel modulo contenente 5 membrane modificate, dopo l'adsorbimento il siero è stato raccolto e alimentato nuovamente per una seconda fase di adsorbimento, quindi sono seguite le fasi di lavaggio ed eluizione condotte in accordo con le prove di tipo B.

Purtroppo, come si evince dalla Figura 5.12, il doppio adsorbimento oltre a rendere il processo cromatografico più lungo, non ha prodotto un incremento di proteina eluita rispetto alle prove con un singolo adsorbimento (Figura 5.4).

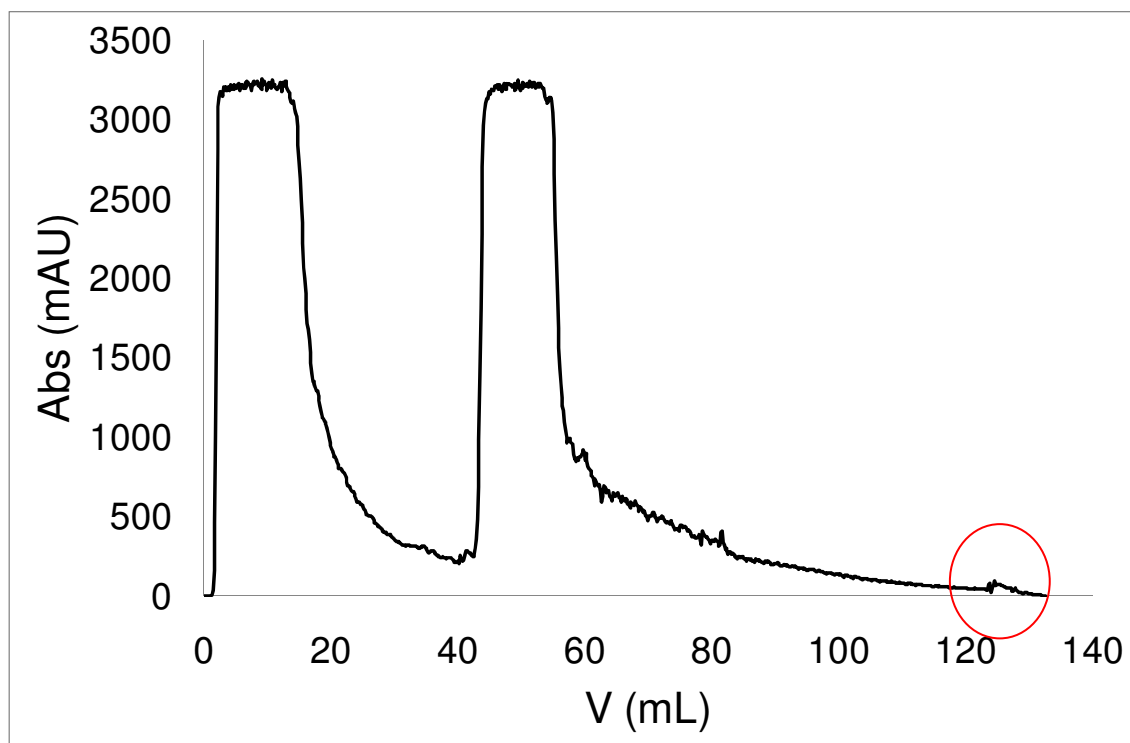


Figura 5.12 Cromatogramma relativo alla prova con doppio adsorbimento.

5.6 Studio della stabilità del legame: due cicli cromatografici successivi

Nei capitoli introduttivi è stato evidenziato che tra i vantaggi di purificare il plasminogeno mediante membrane di affinità vi è anche quello di poter utilizzare un materiale monouso adatto all'applicazione prevista.

Di conseguenza le prestazioni delle membrane sono state valutate rispetto ad un unico ciclo cromatografico, però al fine di valutare la stabilità di legame instauratosi tra i gruppi epossidici delle membrane e la L-lisina, le stesse membrane sono state sottoposte a due cicli cromatografici successivi.

I due cicli sono stati realizzati applicando le stesse condizioni applicate alle prove di tipo A, pertanto sono stati alimentati sempre 10 mL di siero diluiti 1:2.

Il cromatogramma relativo al primo ciclo è stato confrontato con quello relativo al secondo ciclo (Figura 5.13).

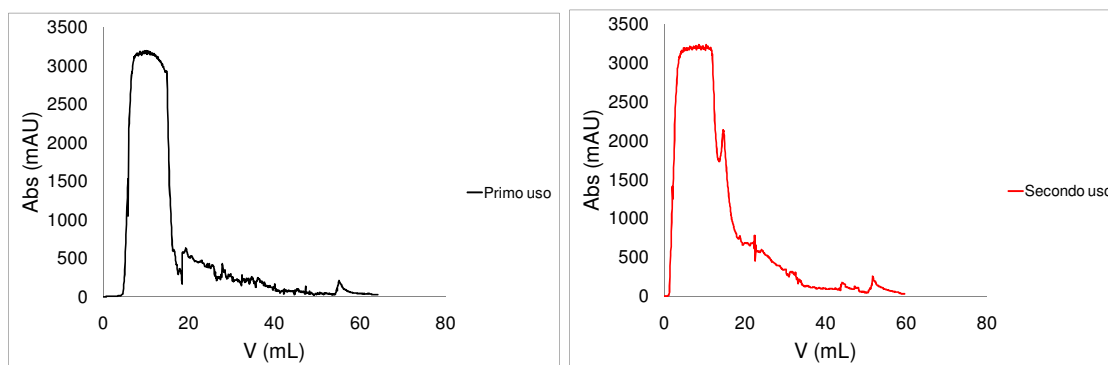


Figura 5.13 Due cicli cromatografici con lo stesso set di membrane: primo utilizzo (a sinistra) e secondo utilizzo (a destra).

Evidentemente l'andamento dei due cicli cromatografici è analogo e richiede lo stesso tempo per arrivare a compimento.

Si osserva che il lavaggio durante il secondo ciclo cromatografico si realizza in modo meno uniforme, indicando una maggiore difficoltà nella rimozione delle proteine.

Come di consueto il picco di eluizione dei due cicli è stato raccolto in frazioni da 1 mL sottoposte ad elettroforesi (Figura 5.14).

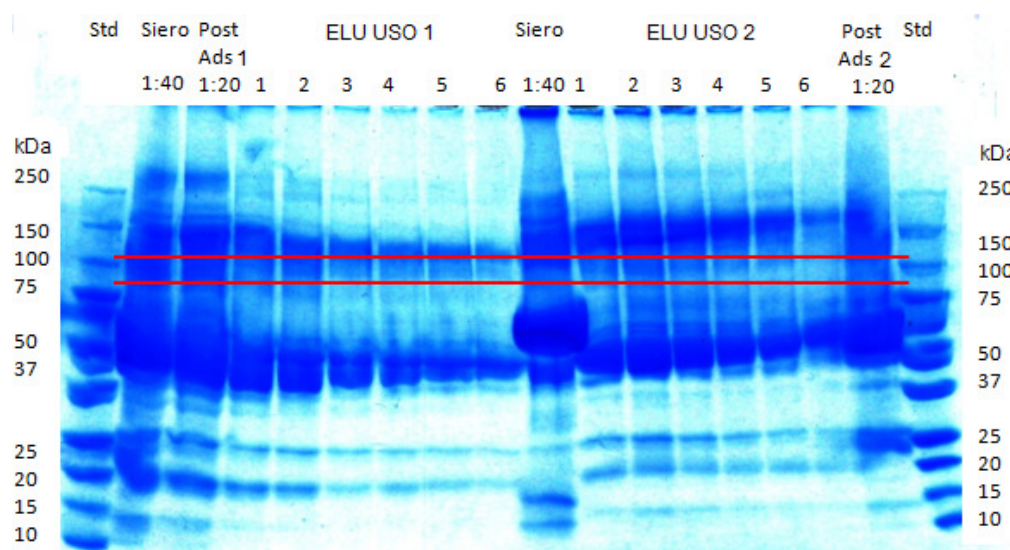


Figura 5.14 Elettroforesi degli eluati dei due cicli cromatografici.

Sono state analizzate 6 frazioni di eluizione provenienti da ognuno dei due cicli, indicate con il nome “ELU USO 1” e “ELU USO 2”.

In rosso è evidenziata la regione in cui si trova la banda tipica del plasminogeno compresa fra i pesi molecolari di 75 e 100 kDa, presente in entrambe le eluizioni.

Guardando i risultati dell'elettroforesi emerge che le bande proteiche presenti nell'eluato raccolto dopo il secondo uso delle membrane, risultino essere in

numero superiore e molto più intense rispetto a quelle presenti nei campioni raccolti durante il primo uso delle membrane.

Questo risultato indica che le membrane perdono la loro selettività con l'utilizzo, riducendo le loro prestazioni.

Al termine dei due cicli cromatografici una membrana campione è stata sottoposta al saggio colorimetrico con l'acido arancio 7 al fine di valutare la quantità di ligando ancora presente. Dopo tale misura è emerso che la densità di ligando si è abbassata del 17%, valore che dimostra una buona stabilità di legame tra ligando e siti attivi della membrana.

5.7 Studio della densità di ligando in funzione della temperatura

Nel Paragrafo 5.1.2 sono stati riportati i risultati relativi allo studio della densità di ligando in funzione della durata della reazione di immobilizzazione e in funzione della concentrazione di L-lisina in soluzione, che hanno permesso di stabilire le condizioni più opportune per la modifica delle membrane da caratterizzare: 5 giorni di reazione e 2.5 M di L-lisina.

In quel momento della ricerca sono stati trascurati gli studi relativi alla densità di ligando in funzione della temperatura perché il Protocollo II, reperito in letteratura, indica la temperatura di 50°C come temperatura ottimale per la modifica [59].

Tenendo conto che il protocollo originario non fa riferimento all'immobilizzazione della L-lisina su membrane epossidiche ma all'immobilizzazione di L-lisina-HCl su resina epossidica, si è pensato di monitorare anche l'influenza della temperatura sulla modifica delle membrane.

Pertanto la densità di ligando è stata studiata alle temperature di 35, 50 e 65°C per una reazione avvenuta in 3 giorni con una densità di L-lisina in soluzione pari a 2.5 M.

Il grafico della densità di ligando in funzione della temperatura (Figura 5.15) mostra un massimo proprio in corrispondenza della temperatura pari a 50°C, registrando un brusco calo alla temperatura di 65°C.

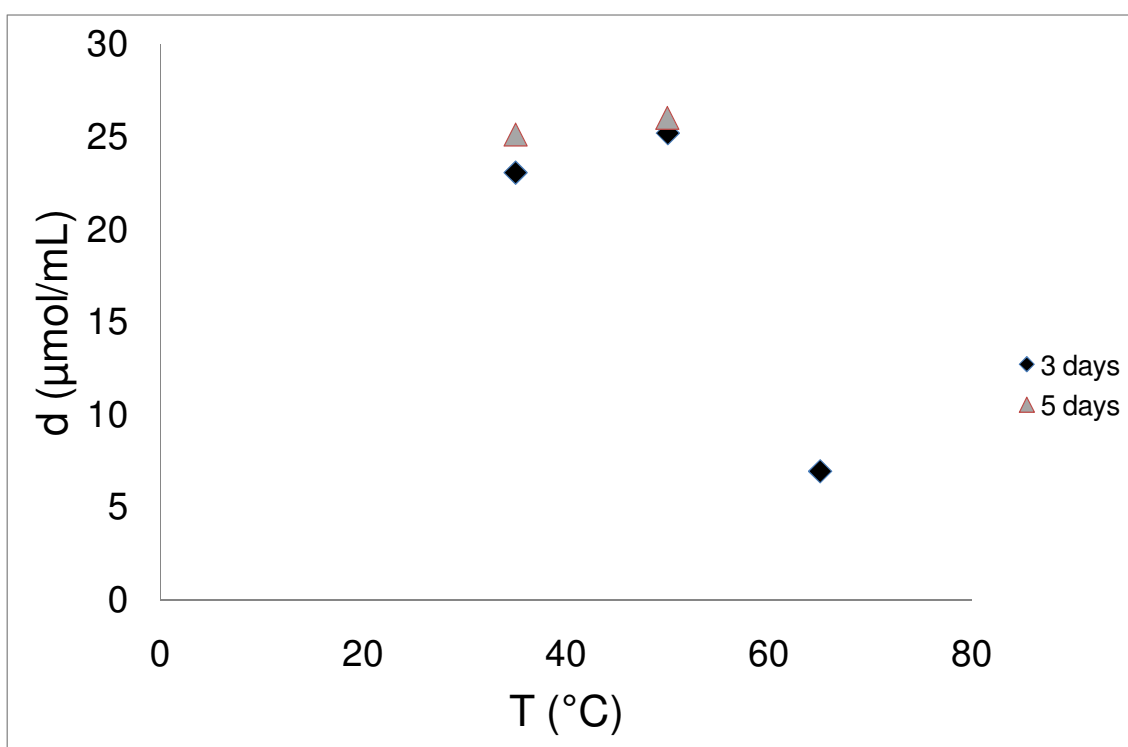


Figura 5.15 Densità di ligando in funzione della temperatura.

Durante il saggio colorimetrico realizzato sulle membrane per definire la densità di ligando immobilizzato è stato riscontrato un rapido rilascio di acido arancio 7 da parte della membrana modificata a 35°C in 3 giorni, a causa del legame non ancora stabilizzato, come già dimostrato in precedenza.

Per questo motivo è risultato opportuno ripetere la modifica a 35°C per 5 giorni, ma anche in questo caso, pur ottenendo un valore minore solo del 3% rispetto a quello ottenuto con l'analoga modifica avvenuta in 5 giorni, il rilascio del colorante è avvenuto in un tempo molto ridotto rispetto a quello impiegato per rilascio da parte delle membrane modificate in 5 giorni a 50°C.

Questo risultato indica che alla temperatura di 35°C la reazione di immobilizzazione del ligando non è stabilizzata.

Per completezza un ciclo cromatografico in condizioni analoghe a quelle applicate durante le prove di tipo A, è stato realizzato con 5 membrane modificate in 5 giorni con 2.5 M di L-lisina alla temperatura di 35°C, ma senza alcun risultato in eluizione.

In conclusione è stato dimostrato che la temperatura ottimale da applicare per la modifica delle membrane seguendo il Protocollo II sia proprio 50°C.

5.8 Utilizzo di L-lisina-HCl come ligando alternativo

Come accennato in precedenza, il Protocollo II, così come riportato in letteratura, prevede l'immobilizzazione della L-lisina-HCl su resina epossidica [59].

La L-lisina- HCl ha peso molecolare pari a 182.65 g/mol e si caratterizza per la presenza del gruppo HCl che le conferisce una maggiore solubilità in soluzioni acquose e per la sua economicità rispetto alla L-lisina.

Durante la sperimentazione si è preferito usare L-lisina per analogia con la resina commerciale L-lysine HyperD® scelta, in modo da confrontare adeguatamente i due supporti, ma va da sé che sarebbe opportuno verificare il

comportamento delle membrane anche rispetto all'immobilizzazione della L-lisina-HCl.

Pertanto per raccogliere informazioni sulla quantità di ligando immobilizzato durante la modifica delle membrane, è stata studiata la densità di ligando in funzione della concentrazione di L-lisina-HCl in soluzione per una modifica durata 5 giorni alla temperatura di 50°C.

Il grafico riportato in Figura 5.16, mostra chiaramente che la densità di ligando immobilizzato, a differenza di quanto verificato nel caso della L-lisina, non dipende dalla concentrazione di L-lisina-HCl in soluzione.

Il valore della densità di ligando è in media $7.62 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{mol/mL}$, che pur risultando solo un terzo del valore ottenuto con la L-lisina (26.00 ± 0.48), è perfettamente confrontabile con i dati riportati in letteratura per la resina epossidica ($3\text{-}7 \text{ } \mu\text{mol/mL}$) [59].

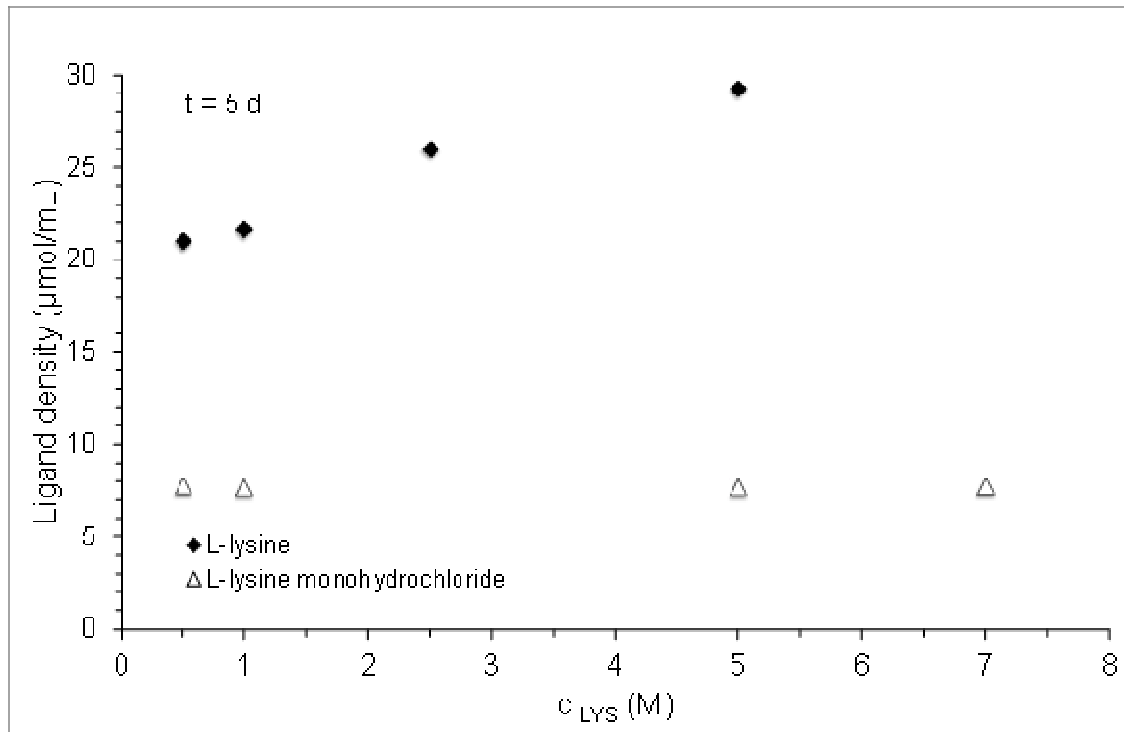


Figura 5.16 Densità di ligando in funzione della concentrazione di L-lisina-HCl in soluzione.

Cinque membrane di affinità con L-lisina-HCl sono state sperimentate come supporto cromatografico nelle stesse condizioni in cui sono state utilizzate le membrane modificate con L-lisina, cioè alimentando 20 mL di siero bovino diluito 1:2 in tampone fosfato. Purtroppo, a differenza di quanto avvenuto con le membrane modificate con L-lisina, in questo caso nessun picco è stato registrato in fase di eluizione.

Questo comportamento è riconducibile alla bassa disponibilità di ligando offerta dalle 5 membrane; infatti, in base alla densità di ligando calcolata, membrane del volume di 0.44 mL contengono complessivamente 3.35 μmol di L-lisina-HCl, ma questo valore non rientra nell'intervallo compreso fra 9-21 μmol riportato in letteratura per il processo con resina epossidica modificata con la stessa L-lisina-HCl [59].

Per questo motivo la quantità di ligando disponibile per l'adsorbimento specifico del plasminogeno è stata aumentata, inserendo un numero più elevato di membrane nel modulo. Dapprima sono state utilizzate 10 membrane che dispongono complessivamente di 6.7 μmol di ligando, ma anche in questo caso il processo cromatografico non ha mostrato alcun picco in eluizione. Ovviamente il ligando disponibile è ancora al di sotto del valore minimo indicato nell'intervallo in cui la resina epossidica funziona per questa applicazione, a questo aspetto si aggiunge il fatto che 10 membrane presentano l'effetto filtro nei confronti del siero, come osservato nel Paragrafo 5.5.1.

Per completezza è stato sperimentato anche il comportamento di 16 membrane, ovvero di un numero di membrane che presentano una quantità di ligando pari a 10.72 μmol che rientra pienamente nell'intervallo 9-21 μmol indicato.

Anche in questo caso nessun picco è comparso sicuramente a causa dell'elevato numero di membrane che si sono intasate.

CAPITOLO 6

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ CON RESINA

L'effettiva efficacia delle membrane di affinità a base di lisina preparate adottando il Protocollo II deve essere verificata dal confronto con i materiali commercialmente disponibili per la stessa applicazione e, in particolare, con una resina da cromatografia comunemente utilizzata per la purificazione di plasminogeno da siero.

Per questo motivo sono state effettuate prove sperimentali di purificazione di plasminogeno da siero umano e siero bovino con resina impaccata in una colonna, in modo da poter confrontare i risultati ottenuti con i due diversi supporti cromatografici e validare il processo di separazione con le membrane di affinità.

6.1 Impaccamento colonna

Una delle resine commerciali adatte alla purificazione di biomolecole che presentano affinità per la lisina è la resina Lysine HyperD® prodotta dalla Pall Corporation [65].

Si tratta di una resina adsorbente composta da particelle rigide aventi una dimensione media di 70 µm di diametro. Questa resina è caratterizzata da un'elevata stabilità a pH compresi tra 3 e 13, ed incompressibilità delle particelle sotto l'azione del pH o di interazioni ioniche.

La sua struttura combina i vantaggi associati all'elevata capacità di adsorbimento specifico del polimero in gel con l'elevata stabilità dimensionale di un granulo rigido. La natura rigida dei granuli consente la formazione di letti stabili capaci di sopportare pressioni fino a 70 bar, permettendo l'utilizzo della resina a portate relativamente elevate rispetto alle resine convenzionali.

Questa caratteristica insieme all'elevata capacità di legame garantiscono un buon livello di produttività del supporto.

La resina L-lysine HyperD® viene commercializzata in sospensione in una soluzione al 20% EtOH e 1 M NaCl (Figura 6.1), pertanto è necessario impaccare la resina all'interno di una colonna.



Figura 6.1 Resina HyperD®Pall.

L'impaccamento è stato effettuato all'interno di una colonna Hi-Trap™ Blue HP, prodotta dalla GE Healthcare, avente volume pari a 1 mL (Figura 6.2) [66]. Questa colonna è stata adattata allo scopo dopo essere stata svuotata della resina esausta contenuta al suo interno.



Figura 6.2 Colonna da 1 mL.

La colonna, è di polipropilene, polimero biocompatibile e a basse interazioni tra la colonna e la soluzione che l'attraversa. Alle estremità della colonna vengono posizionati due dischetti in polipropilene poroso che permettono il passaggio della soluzione evitando che la resina venga trasportata all'esterno dal fluido di passaggio.

Prima di impaccare la colonna, la confezione contenente la resina Lysine HyperD® è stata agitata delicatamente per rimuovere le particelle depositate sul fondo e sulle pareti; quindi con una siringa, la resina mescolata alla soluzione di conservazione, è stata introdotta nella colonna fino a raggiungere l'estremo superiore.

A questo punto la colonna è stata chiusa e l'impaccamento è stato effettuato montando la colonna nel sistema in flusso FPLC Ätka Purifier. In questo modo è stato possibile monitorare le perdite di carico per l'intera durata dell'operazione, realizzata ad una portata compresa fra 0.5 mL/min e 1 mL/min, utilizzando come fluido di impaccamento acqua demineralizzata e filtrata attraverso un filtro

da 45 μm per ridurre la presenza di particelle che potrebbero interagire con il supporto stesso.

Seguendo questa procedura la resina tende a depositarsi in modo uniforme sul fondo della colonna mentre la soluzione di conservazione viene espulsa, abbassando sempre più il livello all'interno della colonna. Dopo aver flussato una certa quantità di acqua, il livello della resina in colonna si è stabilizzato, si è quindi proceduto ad una nuova iniezione di resina prelevata dal flacone e la procedura di impaccamento è stata ripetuta in modo analogo a quanto descritto. L'impaccamento è stato concluso al raggiungimento, da parte della resina, del limite superiore della colonna. Terminata la fase di impaccamento vero e proprio, il flusso in colonna è stato prolungato per 30 minuti ad una portata a gradiente da 1 a 5 mL, al fine di stabilizzare il letto. Infine la resina è stata equilibrata con il tampone di conservazione EtOH 20% e conservata alla temperatura di 4°C.

6.2 Purificazione di plasminogeno con colonna cromatografica

La colonna impaccata con la resina Lysine HyperD® è stata utilizzata per la purificazione del plasminogeno da siero umano e da siero bovino.

Le condizioni operative applicate per la realizzazione del processo cromatografico, riportate in Tabella 6.1, sono le tipiche condizioni applicate alla cromatografia di affinità con resina per la separazione del plasminogeno, indicate dalla GE, già applicate alle membrane di affinità modificate in accordo con il Protocollo I.

Tabella 6.1 Condizioni operative.

Fasi della cromatografia	Protocollo I
Equilibratura	50 mM tampone fosfato, pH 7.5
Adsorbimento	Siero umano/bovino diluito 1:2 in tampone fosfato
Lavaggio 1	Tampone fosfato 50 mM, pH 7.5
Lavaggio 2	Tampone fosfato 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.5
Eluizione	Acido aminocaproico 0.2 M in acqua distillata

I processi cromatografici realizzati con la colonna e quelli realizzati con le membrane di affinità, le fasi cromatografiche dei vari processi con la resina sono state condotte alle stesse portate applicate ai processi con le membrane, ovvero alla portata di 0.5 mL/min durante l'adsorbimento e di 1 mL/min durante le altre fasi.

Con la resina Lysine HyperD® sono stati realizzati 3 cicli cromatografici, che si differenziano per l'origine del siero e per le quantità alimentate.

Durante il primo processo cromatografico con la colonna è stato alimentato il siero umano proveniente dalla Banca del sangue dell'arcispedale di Reggio Emilia.

Nella colonna è stato alimentato un volume totale di circa 7.5 mL di siero diluito 1:2 con tampone fosfato. Si noti che, in base alla disponibilità di siero, era stata preparata una quantità nominale di 10 mL, che si è ridotta a causa della filtrazione.

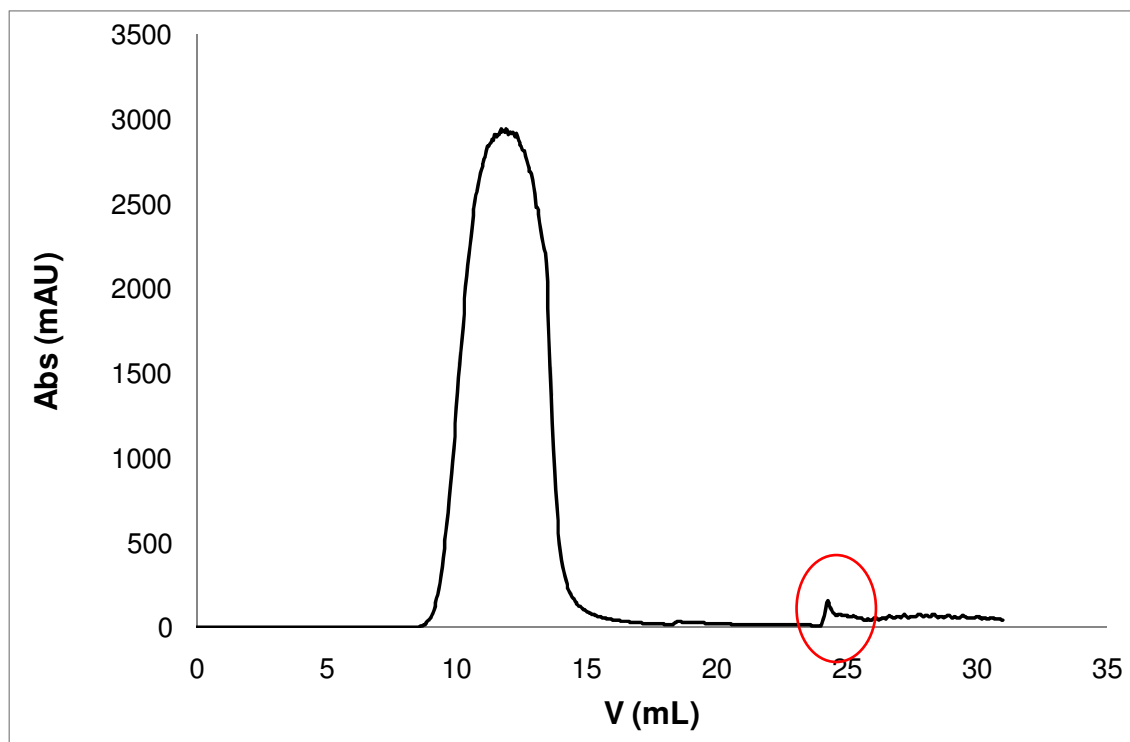


Figura 6.3 Cromatogramma della prova con resina alimentando siero umano.

Il cromatogramma in Figura 6.3 mostra chiaramente che i lavaggi sono piuttosto rapidi, richiedendo un volume complessivo di circa 10 mL affinché il segnale UV raggiunga la linea di base. Inoltre si osserva che la fase di eluizione, che necessita di un volume di 5 mL, presenta un picco ben definito.

Il secondo e il terzo processo cromatografico sono stati realizzati con siero bovino, alimentando la stessa quantità di siero diluito 1:2, alimentata durante le prove di tipo A e durante le prove di tipo B condotte con le membrane modificate con il Protocollo II (Capitolo 5), ovvero 10 mL e 20 mL.

I cromatogrammi relativi a questi due cicli cromatografici sono riportati nelle Figure 6.4 e 6.5.

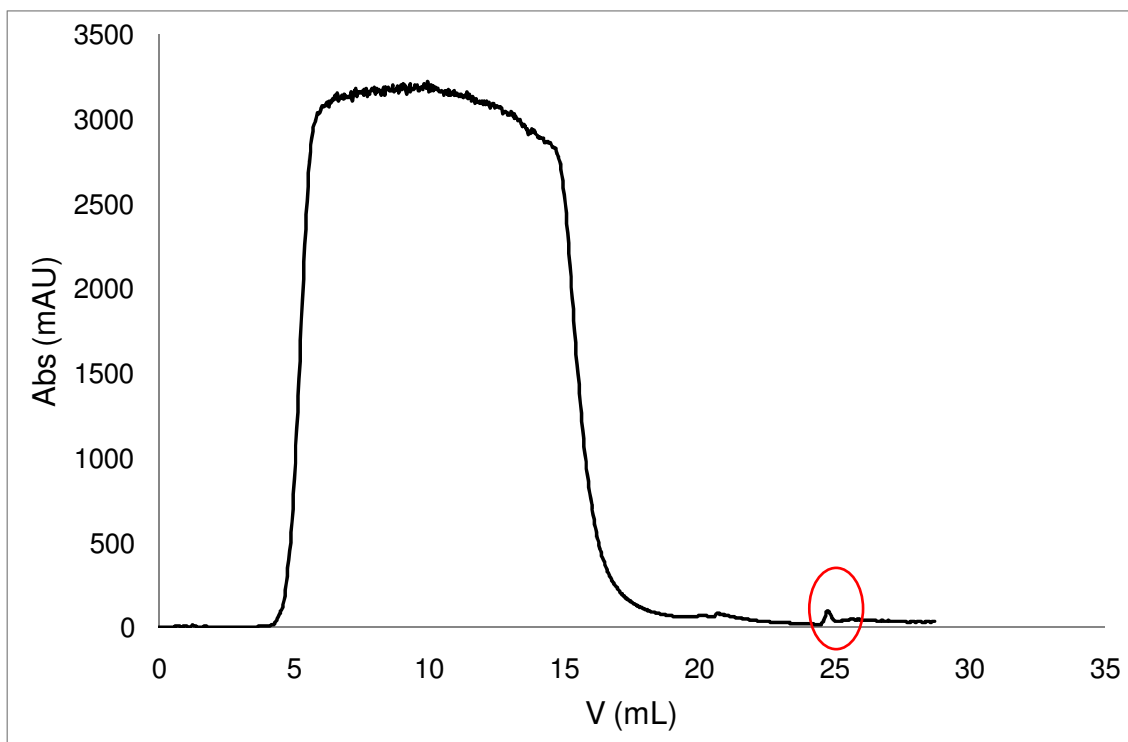


Figura 6.4 Cromatogramma della prova con resina alimentando 10 mL di siero bovino diluito 1:2.

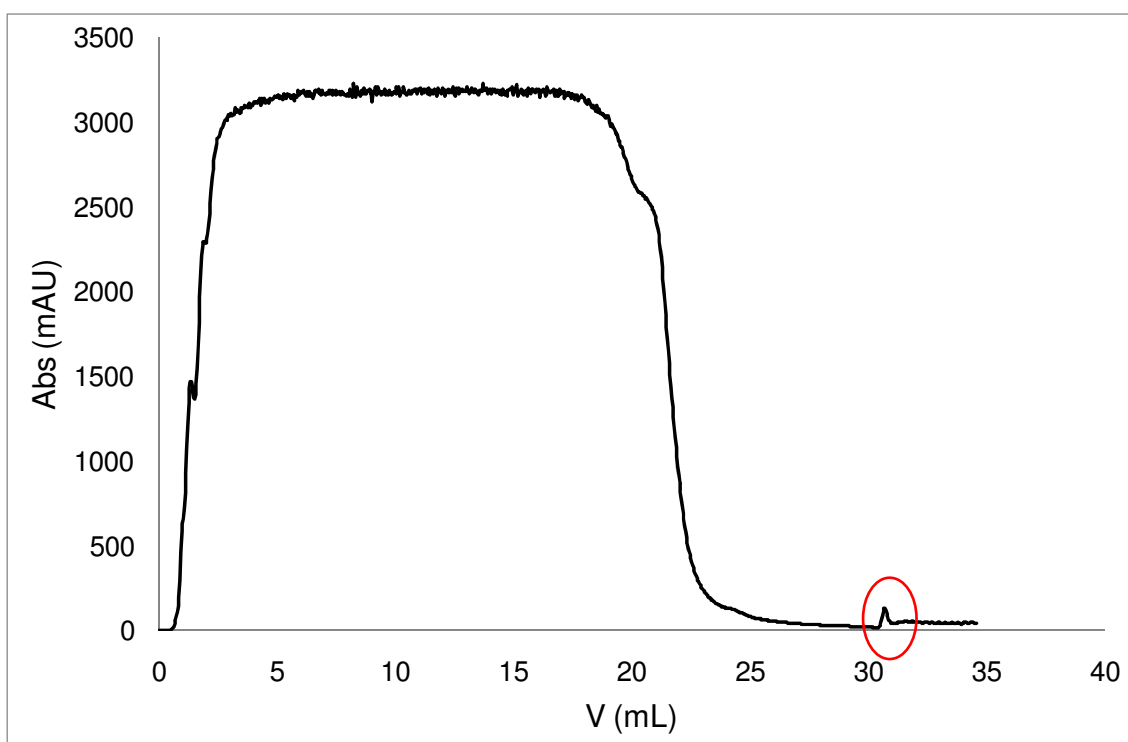


Figura 6.5 Cromatogramma della prova con resina alimentando 20 mL di siero bovino diluito 1:2.

Come si nota dai cromatogrammi delle tre prove, in tutti i processi le fasi di lavaggio e di eluizione vengono completate con la stessa quantità di soluzione, ovvero 10 mL di tampone di lavaggio e 5 mL di eluente.

Anche nelle due prove realizzate con siero bovino si distingue un picco in eluizione, analogamente a quanto osservato usando siero umano.

6.3 Risultati

Come avvenuto per le varie caratterizzazioni dinamiche delle membrane preparate, anche nel caso della cromatografia di affinità realizzata con la colonna, sono stati raccolti i campioni provenienti da ogni fase ed in particolare il picco di eluizione è stato raccolto in frazioni da 1 mL. I campioni raccolti sono stati sottoposti ad elettroforesi al fine di individuare le proteine contenute.

Il gel di elettroforesi, riportato in Figura 6.6, focalizza l'attenzione sull'ultima corsia che contiene il campione raccolto in corrispondenza del picco di eluizione ottenuto dalla prova con siero umano. In questa corsia si distingue in modo netto una banda, che risulta essere corrispondente alla banda caratteristica del plasminogeno, analizzato nella seconda corsia, compresa fra le due bande dello standard, visibile nella prima corsia, a cui corrispondono i pesi molecolari di 75 e 100 kDa.

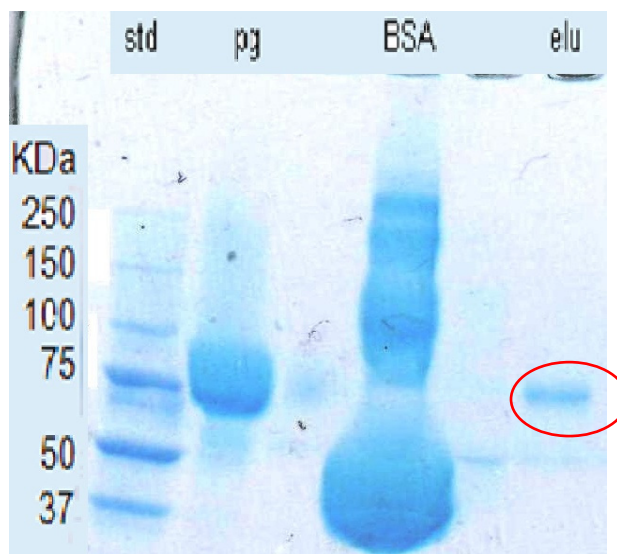


Figura 6.6 Elettroforesi dei campioni raccolti dalla cromatografia con siero umano.

Purtroppo la risoluzione delle bande proteiche derivanti dall'elettroforesi effettuata con questo gel non è risultata tra le migliori, probabilmente a causa di una cattiva conservazione del gel; pertanto non è possibile distinguere le altre bande del plasminogeno né nel campione puro usato come riferimento né nel campione eluito.

Per escludere la presenza di albumina nell'eluato è stata analizzata anche quest'ultima nella terza corsia, ed è evidente che nel campione analizzato non vi è presenza di albumina.

In modo analogo sono stati analizzati i campioni provenienti dalla fase di eluizione dei processi cromatografici realizzati con il siero bovino, riportati in Figura 6.7.

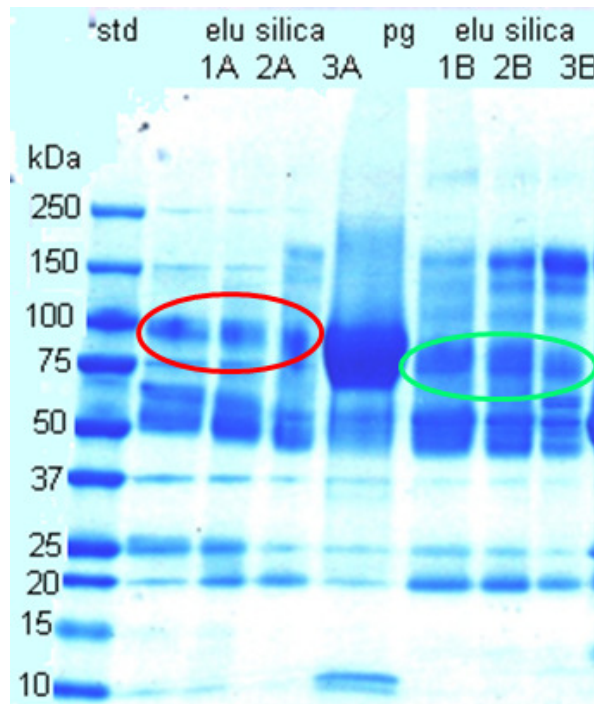


Figura 6.7 Elettroforesi dei campioni raccolti dalla cromatografia con siero bovino.

Tra la seconda e la quarta corsia del gel si trovano le frazioni di eluato, raccolte in corrispondenza del picco di eluizione ottenuto dal processo cromatografico realizzato con 10 mL di siero bovino diluito 1:2, indicate come “elu silica A” per analogia alle prove di tipo A realizzate con le membrane.

Mentre tra la sesta e l’ottava corsia sono state introdotte le frazioni raccolte in corrispondenza del picco di eluizione ottenuto dalla cromatografia realizzata con 20 mL di siero bovino diluito 1:2, indicate con il nome “elu silica B” per analogia con le prove di tipo B realizzata con le membrane.

Al centro del gel è presente un campione di plasminogeno puro, al fine di confrontare direttamente le bande presenti in ogni analisi.

Come al solito, nella prima corsia si trova lo standard di riferimento per l’individuazione dei pesi molecolari delle proteine.

L'elettroforesi condotta sui due gruppi di eluati mostra chiaramente la presenza della banda tipica del plasminogeno con peso molecolare compreso fra 75 e 100 kDa. Inoltre nei campioni analizzati si evidenziano tutte le bande presenti nel plasminogeno puro, garantendo in questo modo la qualità del processo realizzato con la resina impaccata.

In conclusione si può affermare che la resina Lysine HyperD® consente una separazione selettiva del plasminogeno sia da siero umano sia da siero bovino. I risultati ottenuti dal processo cromatografico con la resina commerciale adottata sono diventati il riferimento rispetto a cui valutare la qualità del processo cromatografico realizzato con le membrane di affinità ottenute utilizzando il Protocollo II.

CAPITOLO 7

CONFRONTO FRA PROCESSI CROMATOGRAFICI

I risultati descritti nei capitoli precedenti sono stati confrontati fra loro al fine di verificare l'effettiva validità del processo cromatografico per la purificazione del plasminogeno con le membrane di affinità preparate in accordo con il Protocollo II.

7.1 Analisi e confronto dei risultati

Nel Capitolo 5 sono stati descritti i processi cromatografici realizzati con le membrane di affinità Sartobind Epoxy® al fine di purificare il plasminogeno da siero bovino e da siero umano.

Il profilo del segnale UV associato alle fasi cromatografiche (Figura 7.1), mostra un comportamento analogo delle membrane rispetto alla separazione del plasminogeno da siero umano e da siero bovino.

Come osservato in precedenza, l'unica differenza risiede nella durata del lavaggio, che nel caso della prova con siero umano risulta essere più lunga, probabilmente a causa della diversa origine dei due fluidi biologici.

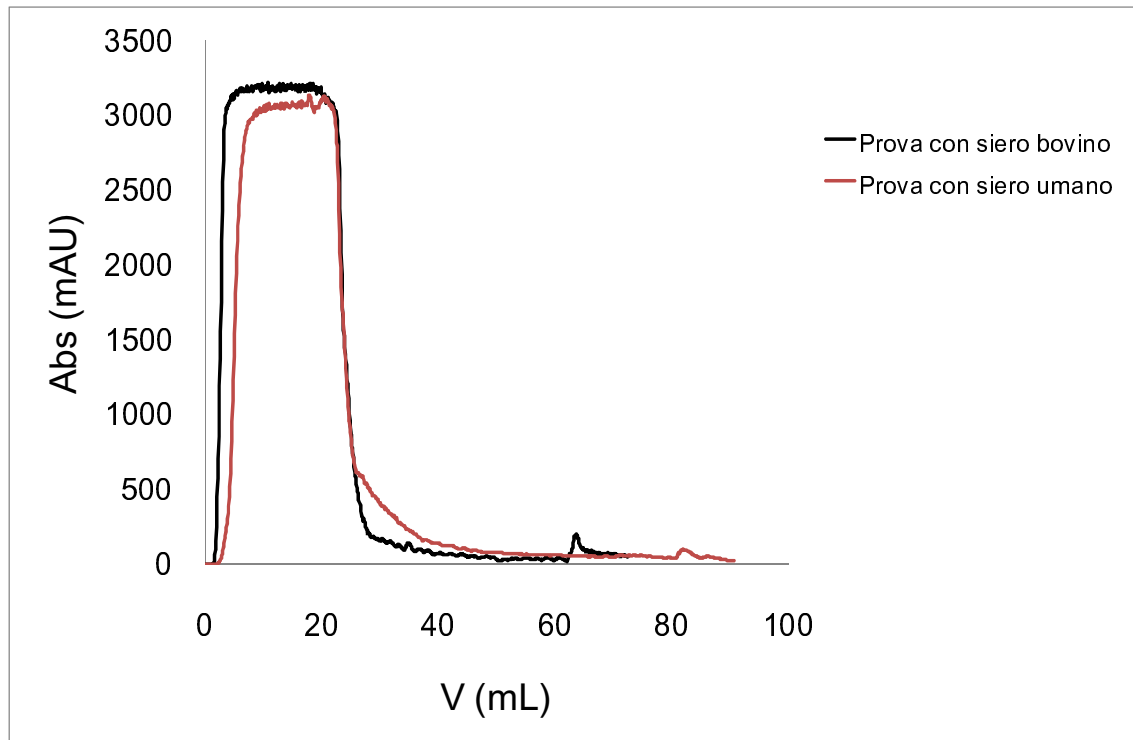


Figura 7.1 Confronto fra i cromatogrammi delle prove realizzate con membrane di affinità alimentando siero bovino e siero umano.

Dall'analisi elettroforetica delle frazioni raccolte in corrispondenza dei picchi di eluizione, si osserva che le bande proteiche presenti nelle eluizioni delle due prove (con siero bovino Fig. 5.5 e con siero umano Fig. 5.8) sono le stesse e sono esattamente corrispondenti a quelle presenti nel plasminogeno puro di riferimento.

Questi risultati consentono di affermare che le membrane di affinità hanno un analogo comportamento con siero bovino e con siero umano e che anche la resina Lysine HyperD® (Capitolo 6) garantisce le stesse prestazioni.

Pertanto, considerando la notevole disponibilità di dati raccolti utilizzando siero bovino, grazie alla sua economicità, si è ritenuto lecito ed opportuno confrontare le prestazioni delle membrane di affinità con quelle della resina rispetto al processo cromatografico per la purificazione del plasminogeno da siero bovino e non da siero umano.

Per realizzare questo tipo di confronto è necessario considerare processi cromatografici condotti con i due diversi supporti a parità di condizioni. A questo scopo sono state confrontate le prove effettuate con le membrane di affinità, indicate nel Capitolo 5 con il nome di Prove A e Prove B con le prove corrispondenti effettuate con la resina. Si ricorda che le prove di tipo A e le prove di tipo B si distinguono per la diversa quantità alimentata di siero bovino diluito 1:2 con tampone fosfato: rispettivamente 10 mL nel caso delle Prove A e 20 mL nel caso della Prove B.

È importante sottolineare che per ogni prova realizzata con le membrane è stato usato un nuovo set di membrane, mentre le prove condotte con la resina sono avvenute utilizzando sempre la stessa colonna impaccata a causa del costo della resina. Inoltre, si ricorda che il volume del mezzo cromatografico costituito dalle membrane è circa la metà di quello costituito dalla resina (0.44 mL vs 1 mL).

La Figura 7.2 mostra il confronto fra il comportamento dei due supporti alimentando un volume complessivo di 10 mL di siero diluito 1:2.

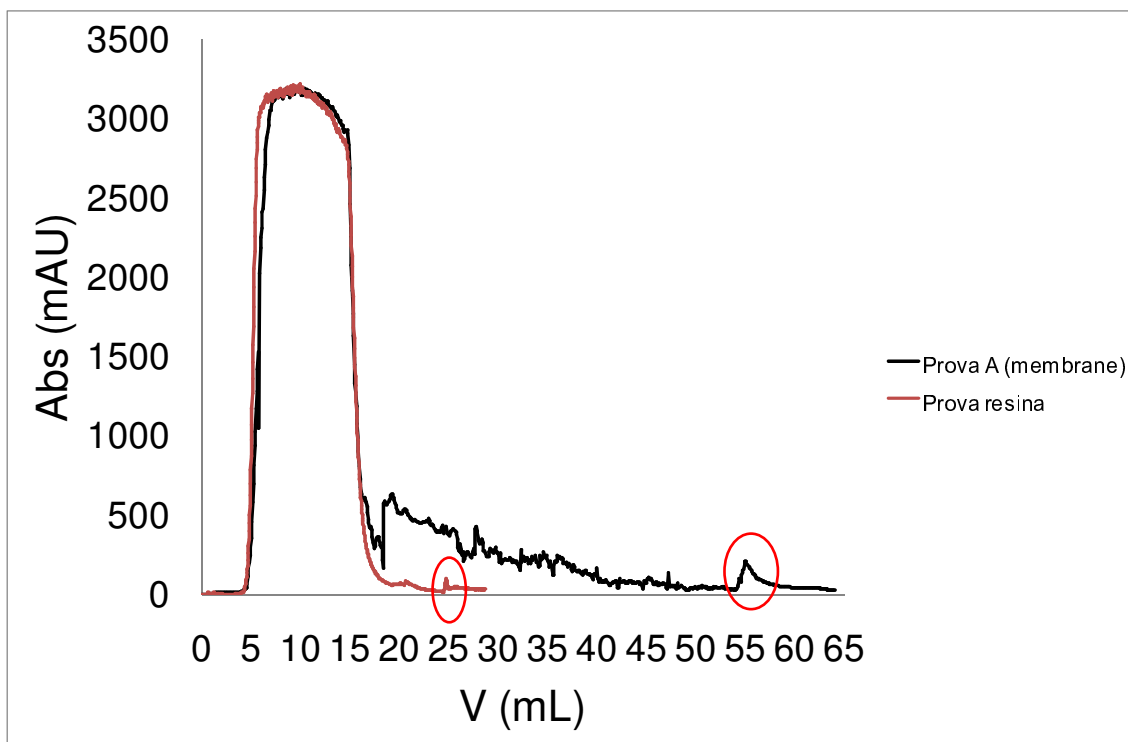


Figura 7.2 Confronto fra i cromatogrammi relativi ai due supporti alimentando 10 mL di siero diluito.

Il confronto fra i due cromatogrammi mostra chiaramente la sovrapposizione dei due segnali UV relativi alla fase di adsorbimento. Se da una parte risulta evidente che il lavaggio associato alla prova con resina sia più rapido rispetto a quello con membrane, dall'altra il picco di eluizione, che compare in corrispondenza della prova con membrane, risulta essere molto più ampio del picco ottenuto con la prova con la resina. In particolare la quantità di proteina eluita attraverso il processo a membrana (1.1 mg) risulta essere superiore del 70% rispetto a quella raccolta con il processo con resina (0.3 mg).

Un andamento simile si registra anche nella seconda prova in corrispondenza di un volume di alimentazione di 20 mL (Figura 7.3).

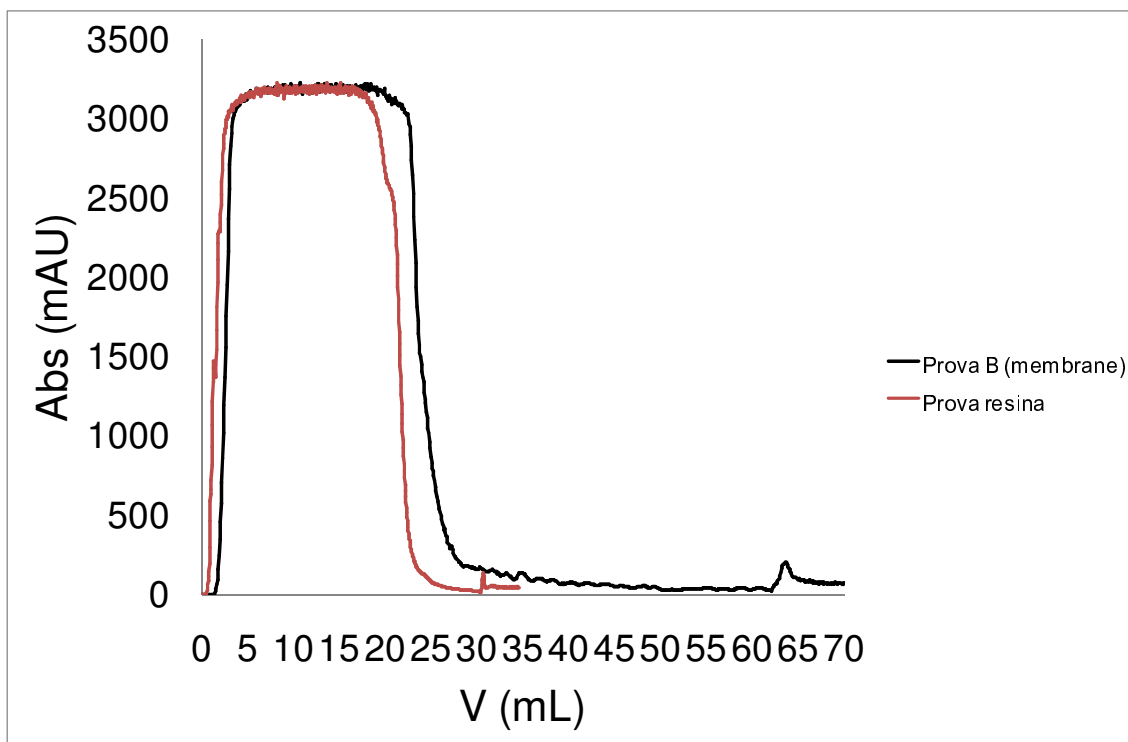


Figura 7.3 Confronto fra i cromatogrammi relativi ai due supporti alimentando 20 mL di siero diluito.

Anche in questo caso, le due prove, pur risultando qualitativamente confrontabili, si differenziano notevolmente per l'ampiezza del picco di eluizione. Si osserva che la proteina eluita attraverso la prova con membrane (1.88 mg) risulta essere circa l'80% superiore rispetto a quella eluita con la prova con resina (0.37 mg).

Nei capitoli dedicati ai processi cromatografici realizzati con i due supporti (Capitolo 5 e Capitolo 6), è stato dimostrato come entrambi siano in grado di separare il plasminogeno.

La Figura 7.4 confronta i risultati ottenuti dall'analisi elettroforetica delle frazioni di eluato raccolte in corrispondenza dei picchi registrati nelle prove con i due diversi supporti. In particolare, il gel è diviso in due regioni, separate dalla corsia

contenente siero bovino diluito 1:80, nella parte sinistra compaiono le corsie dedicate alle analisi sugli eluati raccolti dalle prove con la resina, indicate con il nome “elu silica”, mentre nella parte destra si trovano le analisi sugli eluati raccolti in corrispondenza delle prove con le membrane chiamate “elu memb”. Ogni gruppo di analisi è a sua volta separato dalla corsia contenente il plasminogeno puro. Si noti che con la lettera A sono indicate le eluizioni associate alle prove condotte alimentando 10 mL di siero diluito e con la lettera B quelle condotte alimentando 20 mL di siero diluito.

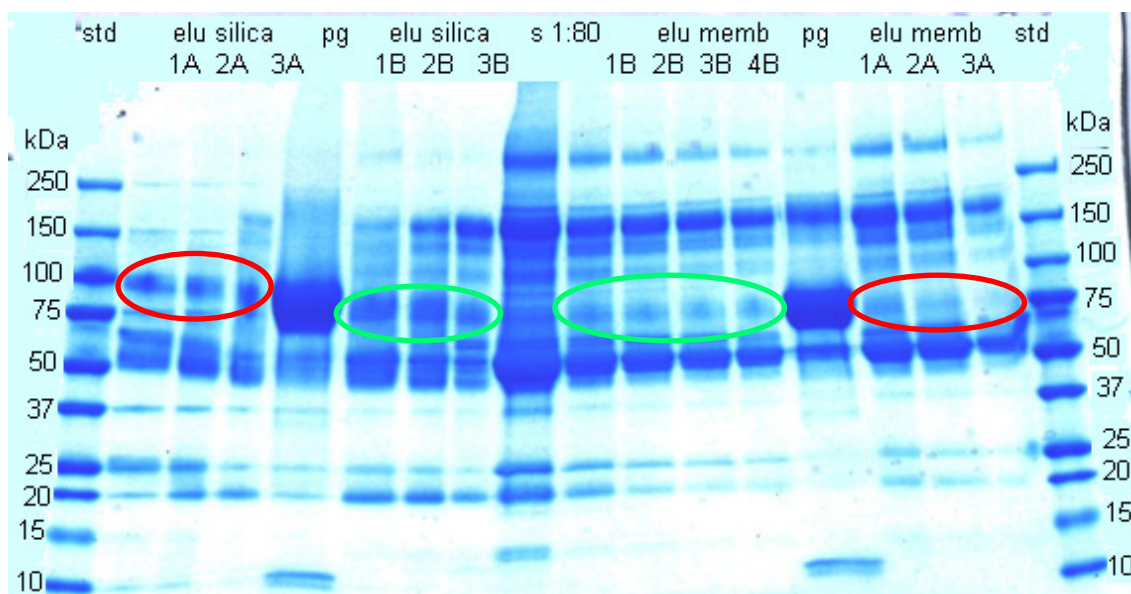


Figura 7.4 Confronto elettroforesi.

L'immagine, abbastanza nitida dell'elettroforesi rivela informazioni interessanti. Indipendentemente dal supporto, i campioni eluiti mostrano esattamente le stesse bande corrispondenti alle bande presenti nel plasminogeno puro di riferimento.

Sicuramente spicca la presenza della banda caratteristica del plasminogeno associata al peso molecolare compreso fra 75 e 100 kDa, che nel caso delle prove di tipo A è evidenziata in rosso, mentre nel caso delle prove di tipo B è evidenziata in verde.

Questa banda appare più intensa in corrispondenza delle analisi condotte con resina rispetto a quelle realizzate con le membrane; questa situazione, pur indicando una maggiore concentrazione di plasminogeno nei campioni analizzati, non dimostra che il plasminogeno eluito con la resina sia in quantità superiore rispetto a quello eluito utilizzando le membrane. Infatti le frazioni raccolte in corrispondenza del picco di eluizione sono state solo 3 nel caso della resina e ben 6 nel caso delle membrane, anche se per esigenze operative, nel gel sono state analizzate solo 4 frazioni di campione eluito per la Prova B e 3 frazioni per la Prova A.

Per raccogliere informazioni più dettagliate sulla capacità di separazione dei due supporti, le frazioni di eluizione sono state sottoposte ad analisi SEC, che consente il confronto diretto tra i campioni analizzati.

Tutte le frazioni di eluato raccolte in corrispondenza delle due prove con i due supporti sono state analizzate e confrontate fra loro. I cromatogrammi riportati in Figura 7.5 e 7.6 rappresentano un tipico confronto fra i campioni eluiti.

In particolare in Figura 7.5 sono confrontati due campioni provenienti dalla fase di eluizione in prove di tipo A: con la linea continua è indicato il segnale corrispondente alla prova con le membrane mentre con la linea tratteggiata è indicato il segnale associato alla prova con la resina.

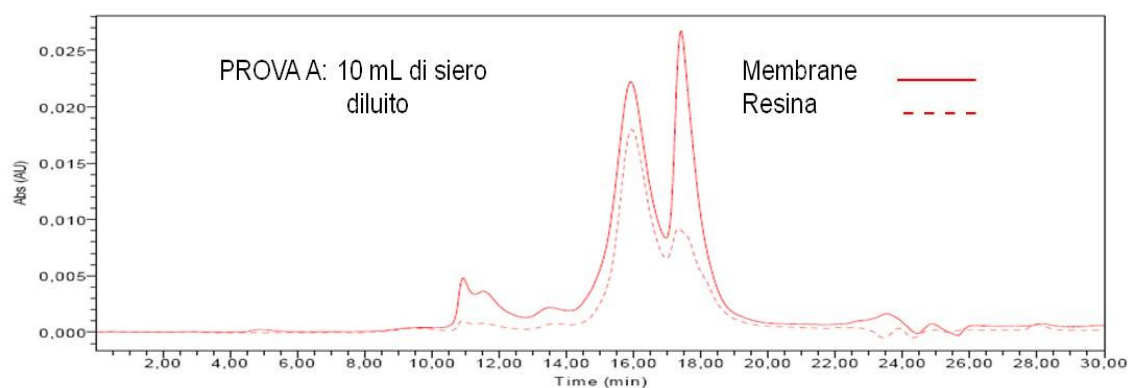


Figura 7.5 Analisi SEC: confronto tra eluizioni in prove con resina e membrane in prove di tipo A.

La Figura 7.5 mostra chiaramente che il comportamento dei due diversi supporti nella separazione del plasminogeno è totalmente analogo, infatti i due segnali risultano essere perfettamente confrontabili.

In entrambi i segnali si distinguono tre picchi principali: il primo in corrispondenza di un tempo di ritenzione compreso fra 10 e 12 minuti, il secondo in corrispondenza di 16 minuti e il terzo, contiguo al secondo, a circa 18 minuti.

Si osserva che i valori dell'assorbanza associati alla prova con membrane risultano essere più rilevanti, suggerendo una migliore capacità di separazione da parte di questo supporto.

Un comportamento del tutto simile si registra anche in prove di tipo B, come riportato in Figura 7.6: anche in questo caso la linea continua è associata al segnale proveniente dalla prova con membrane e la linea tratteggiata a quello proveniente dalla prova con la resina.

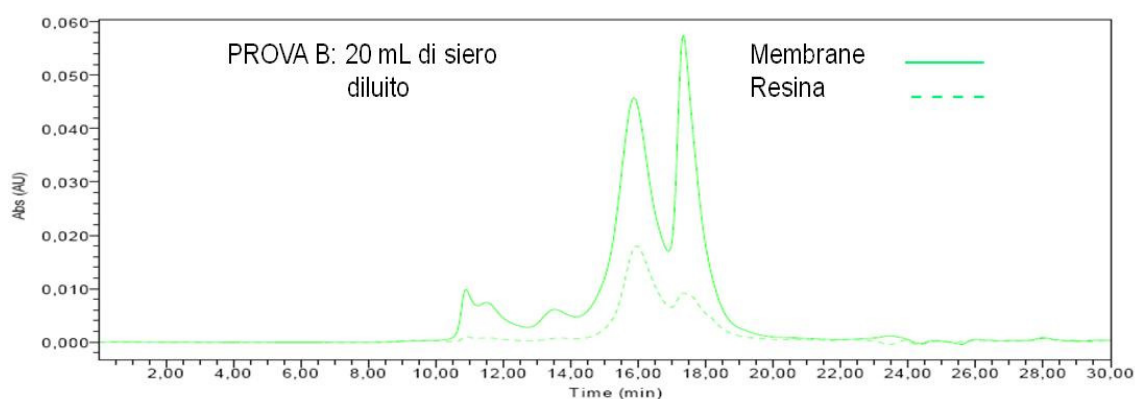


Figura 7.6 Analisi SEC: confronto tra eluizioni in prove con resina e membrane in prove di tipo B.

In questo caso il segnale UV associato alle prove di tipo B con membrane risulta essere doppio rispetto a quello ottenuto in prove di tipo A, rispettando pienamente le attese in quanto è stata alimentata una quantità doppia di siero. La stessa considerazione non può essere fatta nel caso della resina, infatti il segnale registrato in questa seconda analisi è dello stesso ordine di grandezza di quello ottenuto nella prima analisi.

Questo comportamento potrebbe indicare da un lato che la resina abbia un numero di siti di legame che si saturano con una quantità di proteina adsorbita in corrispondenza di una alimentazione di 10 mL di siero diluito 1:2 e dall'altro che la resina abbia risentito del ciclo cromatografico precedente perdendo capacità di adsorbimento.

Sono stati sottoposti ad analisi SEC anche due campioni di plasminogeno e di BSA (Bovin Serum Albumin) in modo da confrontare queste proteine pure con le eluizioni raccolte.

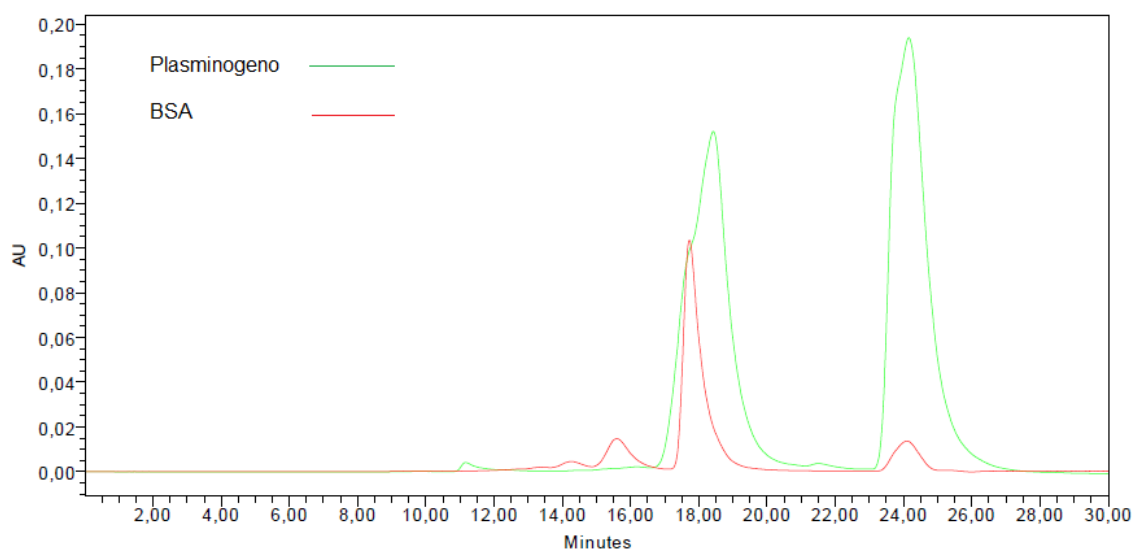


Figura 7.7 Analisi SEC di campioni di plasminogeno e BSA puri.

Dal cromatogramma riportato in Figura 7.7 risulta evidente che i picchi associati al plasminogeno ed alla BSA non sono ben separati, infatti a meno del primo picco del plasminogeno in corrispondenza di un tempo di ritenzione compreso fra 10 e 12 minuti e del primo picco della BSA in corrispondenza di un tempo di ritenzione di circa 15 minuti, i picchi più pronunciati delle due proteine risultano sovrapposti in un intervallo di tempo compreso fra 16 e 20 minuti.

Si osservano, inoltre, ulteriori due picchi sovrapposti che si estendono in un intervallo di tempo compreso fra 23 e 26 minuti, che sono dovuti ad impurezze poiché ripetendo l'analisi SEC delle due proteine a concentrazione diversa, mentre i picchi caratteristici cambiano altezza gli ultimi due rimangono delle stesse dimensioni, come per esempio mostra la Figura 7.8, che confronta due diverse concentrazioni teoriche di plasminogeno: 0.2 mg/mL e 0.4 mg/mL.

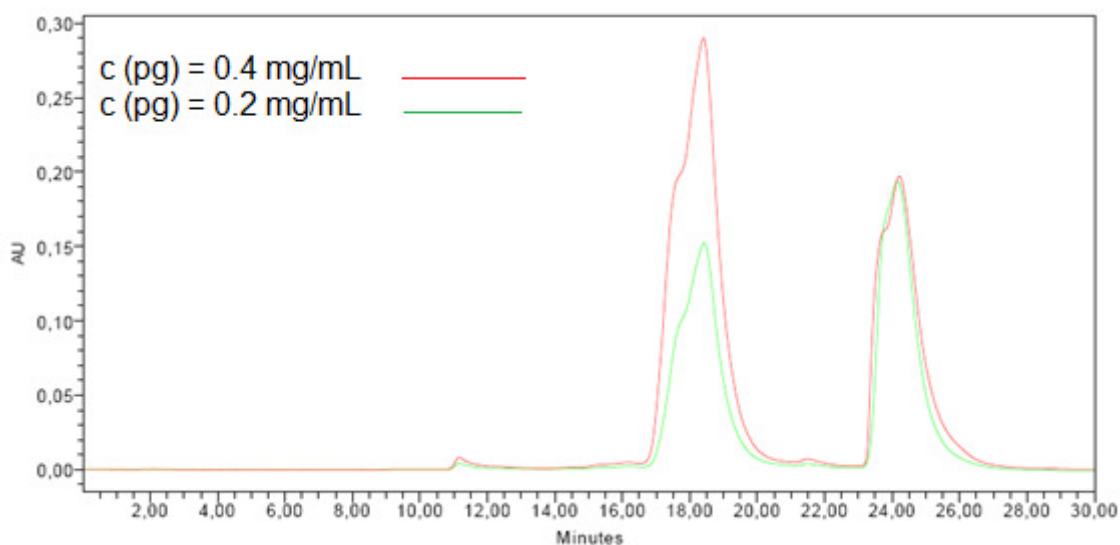


Figura 7.8 Analisi SEC del plasminogeno (pg) a diversa concentrazione.

I risultati raccolti con le analisi SEC se da un lato confermano l'analogo comportamento assunto dalle membrane di affinità e dalla resina rispetto alla separazione del plasminogeno, dall'altro non escludono che durante il processo cromatografico venga isolata anche dell'albumina che, avendo peso molecolare di circa 66 kDa, nell'elettroforesi potrebbe confondersi facilmente con la banda della catena pesante della plasmina già convertita, avente peso molecolare di circa 50 kDa [4].

Pertanto è sorto il dubbio che nelle frazioni eluite si trovi insieme al plasminogeno anche albumina. Per verificare ed eventualmente escludere questa possibilità sono state fatte prove di adsorbimento di soluzioni di albumina pura in condizioni dinamiche. In particolare, 15 mL di BSA pura in tampone fosfato 100 mM alla concentrazione di 1 mg/mL sono stati alimentati a una colonna formata da 5 membrane di affinità nuove utilizzando le stesse condizioni operative delle prove per la separazione del plasminogeno da siero (Tabella 5.2).

Questa prova ha evidenziato che la proteina eluita è 23 µg/mL di membrana, valore che risulta ben due ordini di grandezza inferiore rispetto ai valori tipici delle membrane di affinità per la BSA [67]. Pertanto è ragionevole pensare che le membrane adottate non presentino affinità per la BSA.

In conclusione si può affermare che la banda proteica compresa fra i pesi molecolari di 50 e 75 kDa, che appare nell'elettroforesi dei campioni eluiti dalle membrane sottoposte a cromatografia di affinità alimentando siero bovino, non sia albumina e che sia lecito pensare che si tratti proprio di plasminogeno già convertito in plasmina.

7.2 Cromatografia di affinità combinata

Considerando la bassa concentrazione di plasminogeno nel siero (0.2 g/L) rispetto a quella della BSA (30-50 g/L), si è pensato che l'albumina potesse interferire nell'interazione del plasminogeno con il ligando presente sulle membrane creando delle zone d'ombra e riducendo così la probabilità di legame tra proteina e ligando.

Al fine di favorire l'interazione del plasminogeno con la lisina, il siero è stato sottoposto ad una prova combinata composta da due processi cromatografici in serie. Il primo atto a rimuovere la BSA dal siero e il secondo a isolare il plasminogeno dal siero risultante, secondo lo schema descritto in Figura 7.9.

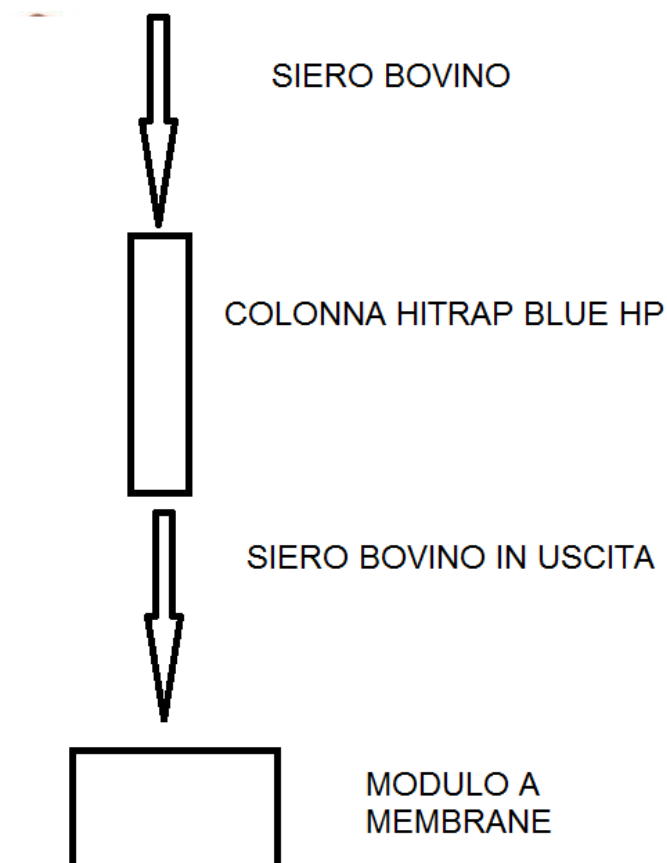


Figura 7.9 Schema del processo cromatografico combinato.

7.2.1 Rimozione della BSA

Durante la prima fase del processo cromatografico combinato, 20 mL di siero bovino diluito 1:2 in tampone fosfato sono stati alimentati nella colonna commerciale HiTrap™ Blue HP distribuita da GE Healthcare [66]. Si tratta di una colonna ad alta prestazione da 1 mL impaccata con resina Blue Sepharose™, aventi particelle con dimensioni medie di 34 µm. Alla matrice è legato in modo covalente il colorante Cibacron Blue, ligando che presenta specificità per l'albumina. Secondo i dati forniti dal produttore la densità di

ligando è 4 mg/mL di resina, mentre la capacità di legame per l'albumina è di 20 mg/mL di resina.

Il processo cromatografico per la separazione della BSA dal siero è stato condotto alla portata di 1 mL/min, come suggerito dalle specifiche tecniche.

Il processo in serie è stato realizzato in due stadi: durante il primo stadio, il siero è stato inviato in colonna e raccolto in uscita, quindi è stato alimentato nel modulo a membrane durante il secondo stadio.

L'effettiva rimozione della BSA da parte della resina è stata dimostrata verificando la presenza del picco in eluizione. Durante le fasi cromatografiche sono stati utilizzati i tamponi indicati dal produttore per questa colonna: 0.1 M Tris-HCl a pH 8 per l'equilibratura e il lavaggio e 0.05 M KH_2PO_4 +1.5 M KCl a pH 7 per l'eluizione.

7.2.2 Separazione del plasminogeno

Il siero raccolto all'uscita della colonna HiTrap™ Blue HP è stato alimentato nel modulo a membrane contenente 5 nuove membrane preparate come stabilito nel Capitolo 5 in accordo con il Protocollo II. Il segnale UV registrato in corrispondenza del processo cromatografico è riportato in Figura 7.10.

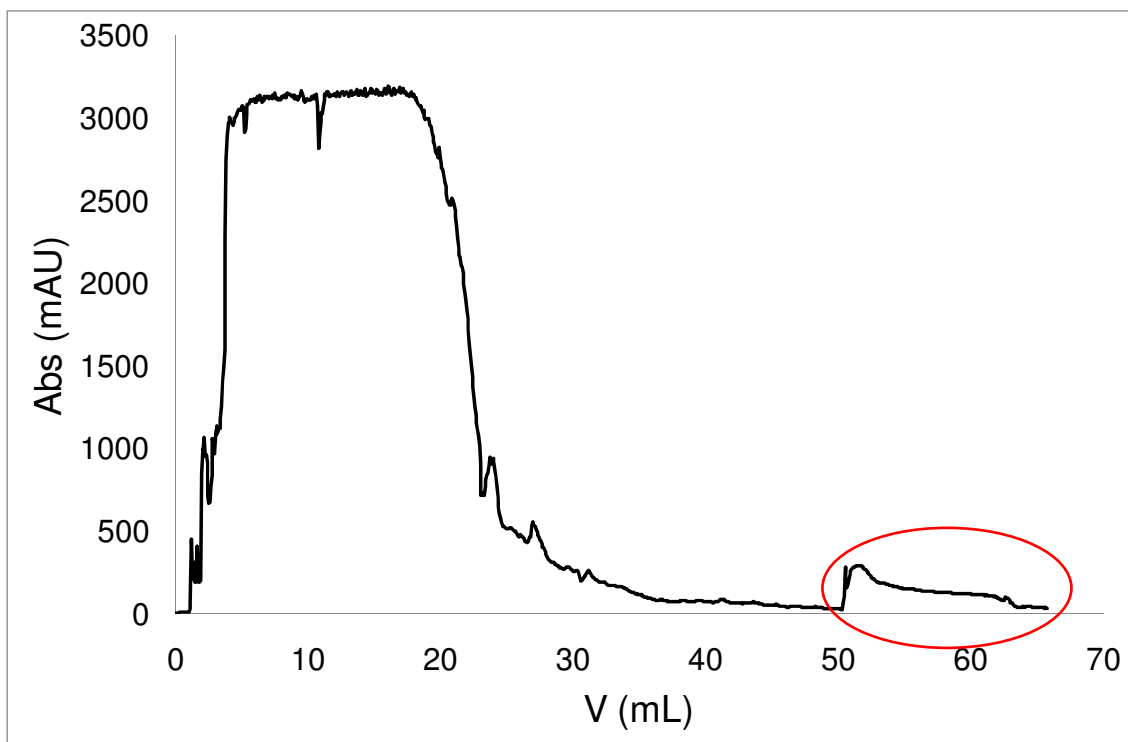


Figura 7.10 Cromatogramma della prova con siero bovino privato della BSA.

Dal cromatogramma, si nota che la fase lavaggio ha richiesto un volume di tampone inferiore rispetto al volume utilizzato nelle analoghe prove precedenti con siero: 30 mL contro 40 mL, comportamento ragionevole avendo già rimosso parte di proteine con la colonna; mentre l'eluizione ha necessitato inaspettatamente di un volume maggiore di eluente 15 mL contro 10 mL. L'eluizione presenta un picco con coda abbastanza allungata, che risulta non essere ben definito come nel caso della prova realizzata con le sole membrane (Figura 5.4). Come di consueto l'eluizione è stata raccolta in frazioni sottoposte ad analisi elettroforetica e SEC.

L'elettroforesi riportata in Figura 7.11 presenta in ordine: lo standard, il plasminogeno e la BSA puri, il siero diluito 1:80, il siero diluito 1:80 alimentato nel secondo processo cromatografico con le membrane, quindi sono stati

inseriti i campioni eluiti durante la prova combinata, denominata “Elu comb”, il plasminogeno, i campioni raccolti durante la prova con la sola resina L-Lysine HyperD® “Elu silica”, ed infine quelli provenienti dalla la prova con le sole membrane “Elu memb”. Si ricorda che le tre prove analizzate sono state realizzate applicando le medesime condizioni operative.

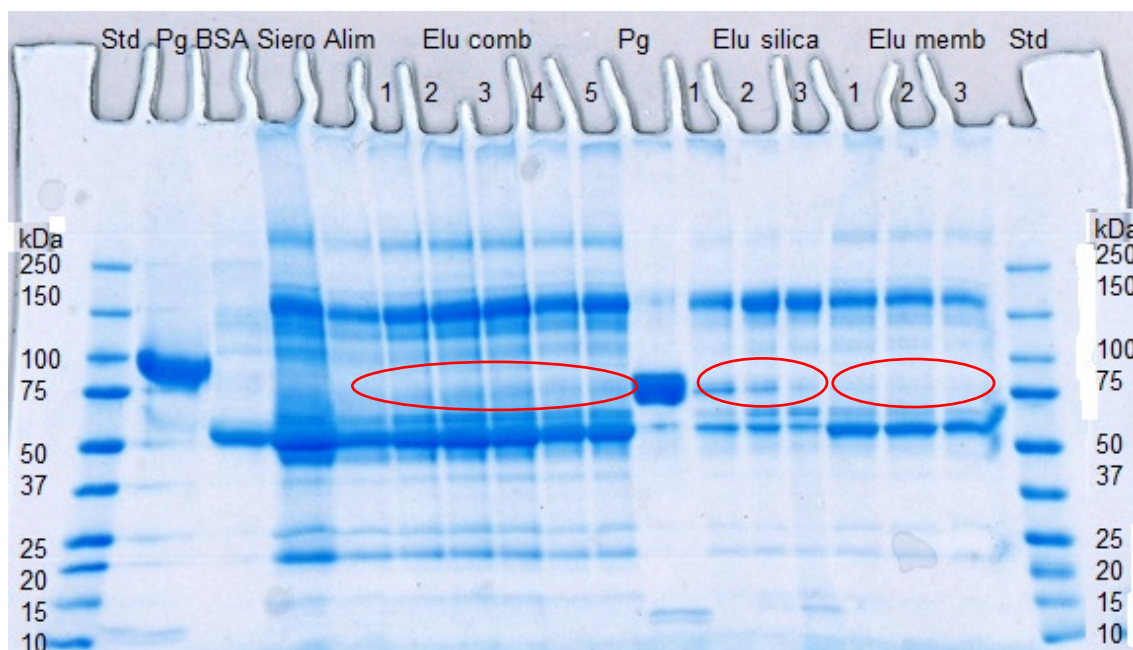


Figura 7.11 Elettroforesi degli eluati provenienti dalle tre prove.

L’analisi mostra chiaramente che le bande proteiche presenti nel siero raccolto in uscita dalla colonna HiTrap Blue™ HP e alimentato durante la prova con le membrane, risultino essere meno intense rispetto a quelle del siero originario. Questo risultato indica che parte delle proteine del siero, oltre alla BSA, sono state rimosse durante il primo processo cromatografico.

Si osserva anche che i campioni dell’eluizione raccolti dalla prova combinata, presentano le stesse bande del plasminogeno puro come già notato nel caso

degli eluati provenienti dalle prove con la sola resina e con le sole membrane. Ciò che sorprende è che le bande proteiche presenti in corrispondenza del peso molecolare della BSA, compreso fra i 50 e i 75 kDa, siano molto più intense nella prova combinata rispetto alle altre due prove.

Questo risultato potrebbe essere messo in relazione con due diversi aspetti: il primo è che la rimozione della BSA da parte della colonna HiTrap™ Blue non sia completa, infatti, come risulta dalla Tabella 7.2, 1 mL di resina riesce a legare 20 mg di proteina, questo valore è un ordine di grandezza inferiore rispetto alla quantità di BSA presente nel siero alimentato, che è superiore a 200 mg; il secondo è che, allungando i tempi del processo, possa esserci una maggiore probabilità di conversione del plasminogeno in plasmina. Quest'ultima ipotesi potrà essere avvalorata o confutata attraverso un saggio di attività enzimatica, programmato per un successivo sviluppo della presente attività di ricerca.

Per raccogliere ulteriori informazioni circa l'esito della prova combinata, i campioni dell'eluizione sono stati sottoposti ad analisi SEC. La Figura 7.12 mostra il confronto fra le eluati raccolti con le tre prove: si nota che il profilo del cromatogramma relativo alla prova combinata è identico a quelle con la prova con le membrane a meno di una lieve sfasatura nella scala dei tempi dovuta al fatto che le analisi sono avvenute in momenti diversi.

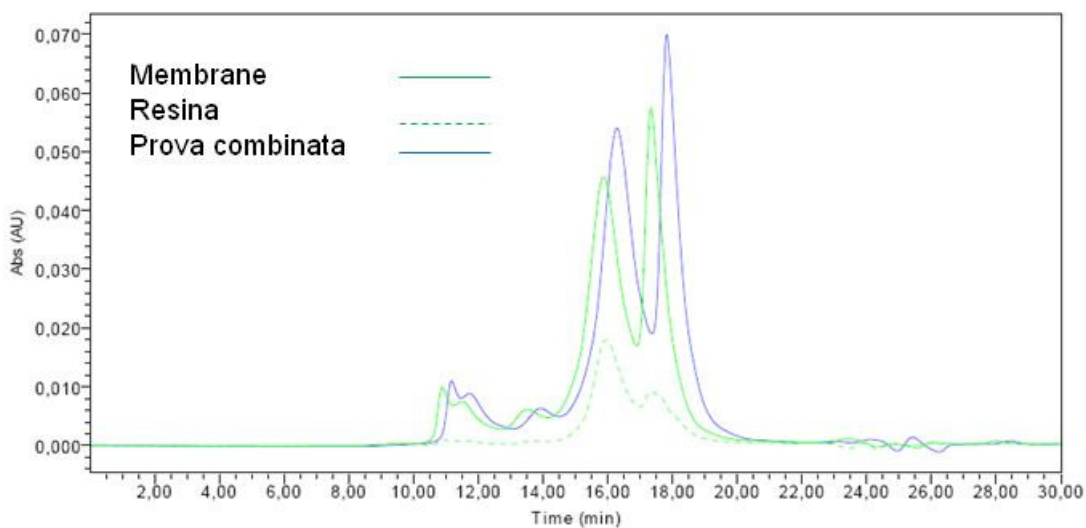


Figura 7.12 Confronto delle analisi SEC degli eluati raccolti dalle tre prove.

Pur osservando che il segnale UV in corrispondenza della prova combinata sia lievemente più alto rispetto a quello registrato in corrispondenza della prova con le membrane e quindi pur ammettendo che con la prova combinata si eluisca una quantità leggermente superiore di proteina rispetto a quella raccolta con la prova con membrane, si ritiene che questo risultato non sia così vantaggioso considerando che i tempi del processo si allungano notevolmente: circa 20 minuti in più a causa della fase di adsorbimento nella colonna HiTrap™ Blue HP. Ricordando che tra gli obiettivi della ricerca vi è proprio la riduzione dei tempi del processo di separazione del plasminogeno, è ovvio che un processo combinato non sia adatto al tipo di applicazione prevista in questo caso.

7.3 Confronti quantitativi fra supporti

Dai risultati raccolti fino a questo momento è emerso che da un punto di vista qualitativo le prestazioni delle membrane di affinità siano superiori rispetto a quelle della resina commerciale L-Lysine HyperD® utilizzata.

Obiettivi fondamentali nell'ingegnerizzazione di qualsiasi processo sono l'ottimizzazione del processo stesso e la minimizzazione dei costi di produzione, al fine di rendere il processo sempre più competitivo.

Pertanto è necessario raccogliere informazioni capaci di fornire confronti di tipo quantitativo fra i due supporti.

7.3.1 Valutazione della produttività

Il tipico parametro da valutare per determinare le prestazioni del supporto nella realizzazione del processo cromatografico è la produttività. Questo parametro definito come:

$$P = m_{ELU} / \Delta t_{ciclo}$$

rappresenta la quantità di proteina eluita rispetto alla durata dell'intero ciclo cromatografico [67]. La quantità di proteina eluita è stata valutata come descritto nel Capitolo 3.

I calcoli sono stati realizzati per la proteina eluita nel corso della cromatografia condotta con le membrane e con la resina, per le prove di tipo A e di tipo B. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 7.3.

Tabella 7.3 Produttività

	P_(PROVA A) (mg/h)	P_(PROVA B) (mg/h)
MEMBRANE	1	1.3 ^(*)
RESINA	0.71	0.62 ^(**)

(*) Nuovo set di membrane.

(**) Resina già utilizzata.

In entrambi i casi la produttività delle membrane è superiore a quella calcolata per la resina di un valore compreso fra il 30 e il 50%, in accordo con quanto visto in lavori precedenti [67, 68].

Si osserva che per le membrane la produttività assume un valore medio di 1 mg/h nel caso delle Prove A e 1.3 mg/h nel caso delle Prove B; mentre per la resina i valori sono sotto l'unità in entrambi i casi e, in particolare, la produttività diminuisce del 12.5% nella prova di tipo B. Questo risultato potrebbe dipendere dal fatto che le prove con le membrane sono state realizzate con nuovi set di membrane, invece le prove con la resina sono state condotte sempre con lo stesso supporto, che potrebbe aver perso efficienza come già notato qualitativamente nel Paragrafo 7.1.

In conclusione, anche la produttività conferma le migliori prestazioni delle membrane di affinità rispetto alla resina nella separazione del plasminogeno da siero bovino a parità di condizioni operative, dimostrando un'efficienza superiore del processo cromatografico con membrane di affinità.

Questa conclusione non sorprende anzi avvalora i risultati raggiunti in precedenti studi [43, 44, 67].

7.3.2 Valutazione dei costi

Per valutare se le membrane di affinità sviluppate in questo lavoro di tesi possano essere competitive dal punto di vista commerciale è importante fare una valutazione dei costi. Pertanto, una volta accertata la superiore produttività delle membrane utilizzate come supporto cromatografico nell'applicazione oggetto dello studio descritto, rispetto a quella della resina commerciale, bisogna quantificare i costi di produzione delle colonne cromatografiche composte con i due diversi supporti.

Quindi per completezza è stata fatta questa valutazione tenendo presenti i costi associati ai materiali, intesi come il supporto stesso, il ligando, i reagenti necessari per la reazione di immobilizzazione; i costi associati al consumo energetico; ed infine i costi associati alla preparazione della colonna stessa.

I costi associati alla produzione dei due materiali di affinità, calcolati nel modo descritto, sono riportati graficamente in Figura 7.13.

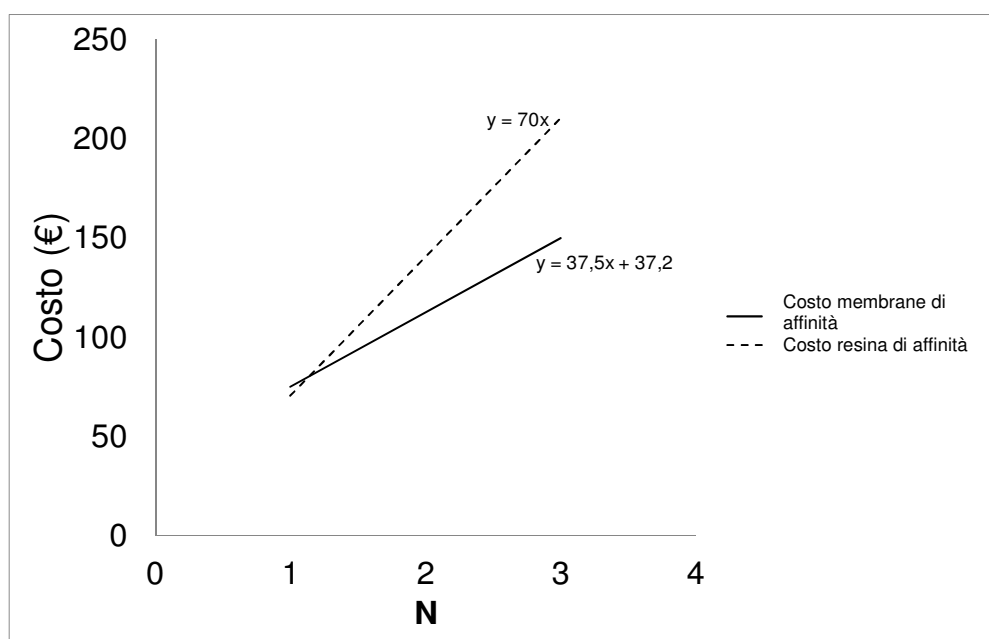


Figura 7.13 Costi di produzione dei due supporti in funzione del numero di colonne cromatografiche preparate.

Nel grafico sono indicate le funzioni dei costi di produzione dei due supporti in funzione del numero (N) di colonne cromatografiche preparate. La retta continua indica la funzione associata alla produzione di colonne cromatografiche contenenti ognuna 5 membrane di affinità, mentre la retta tratteggiata indica la funzione associata alla produzione di colonne cromatografiche da 1 mL contenenti la resina commerciale.

La funzione che descrive i costi associati alla produzione di membrane è composta da i costi del supporto, del ligando e dei reagenti che rappresentano la pendenza della retta, e da un termine noto che rappresenta i costi associati al consumo energetico per la modifica che rimangono fissi per la produzione di più colonne cromatografiche.

La funzione associata alla resina non presenta termini noti poiché non ci sono costi fissi di produzione della colonna, la pendenza si riferisce al costo del supporto già modificato e ai costi del lavoro per l'impaccamento.

Come si nota dal grafico per la produzione di un'unica colonna conviene la resina commerciale, ma all'aumentare del numero di colonne cromatografiche, come accade in ambiente industriale, il costo di produzione delle colonne contenenti le membrane di affinità si abbassa sempre più rispetto a quello della resina, dimostrando il vantaggio economico nell'utilizzo delle membrane di affinità come supporto.

CONCLUSIONI

Durante l'attività di ricerca è stata valutata la possibilità di utilizzare membrane di affinità per la purificazione di plasminogeno per applicazioni oftalmologiche, in alternativa alle usuali resine commerciali.

Per questo motivo sono state preparate membrane di affinità, immobilizzando L-lisina, ligando specifico per il plasminogeno, su membrane ad attivazione epossidica Sartobind Epoxy®, sperimentando e ottimizzando due diversi protocolli di modifica: Protocollo I e Protocollo II.

L'immobilizzazione di L-lisina è stata raggiunta con successo con entrambi i protocolli. In particolare, il Protocollo I ha permesso di ottenere la densità di ligando più alta, e pari a 37 $\mu\text{mol/mL}$ di membrana.

Risultati soddisfacenti dal punto di vista della densità di ligando immobilizzato sono stati raggiunti anche attraverso l'applicazione del Protocollo II con valori di 26 $\mu\text{mol/mL}$ di membrana. Si noti che questo protocollo è stato utilizzato anche per l'immobilizzazione della L-lisina-HCl, ligando alternativo, senza ottenere risultati apprezzabili.

Le membrane modificate in accordo con i due protocolli sono state caratterizzate in processi cromatografici per la purificazione di plasminogeno da siero umano e siero bovino.

Lo studio condotto ha permesso di verificare che il Protocollo I presenta diverse criticità: in primo luogo potrebbero esistere problemi derivanti dalla tossicità del diossano, usato come tampone di reazione; è stata osservata la presenza di

plasminogeno nell'eluato solo con adsorbimento in ricircolo; ed infine è stato dimostrato che tra i gruppi epossidici e la L-lisina si instaura un legame poco stabile.

A differenza delle membrane modificate con il Protocollo I, le membrane modificate con il Protocollo II presentano un legame tra siti attivi e ligando piuttosto stabile. Le prove sperimentali hanno stabilito che membrane modificate con L-lisina-HCl non permettono la separazione del plasminogeno, mentre risultati interessanti si apprezzano con le membrane modificate con L-lisina.

Tutte le prove realizzate con queste membrane hanno dimostrato che esse sono un supporto cromatografico adatto alla separazione del plasminogeno da siero. In particolare applicando le stesse condizioni operative, i processi cromatografici condotti con 5 membrane producono risultati analoghi a quelli ottenuti con la resina commerciale Lysine HyperD® Pall, nonostante il volume delle membrane sia minore della metà del volume della resina.

È stato dimostrato che in termini di produttività del processo cromatografico, le prestazioni delle membrane sono nettamente superiori rispetto a quelle della resina commerciale.

Inoltre, la valutazione dei costi di produzione di colonne cromatografiche contenenti le membrane modificate e di colonne cromatografiche contenenti la resina, ha evidenziato che, su larga scala, l'utilizzo delle membrane di affinità sia più conveniente rispetto all'utilizzo della resina commerciale.

In definitiva, l'attività di ricerca condotta ha permesso di stabilire che le membrane di affinità con L-lisina, presentano, oltre alla facile reperibilità, buone prestazioni e bassi costi di produzione. Pertanto costituiscono un supporto adatto alla separazione del plasminogeno da siero in vista dell'applicazione biomedica prevista.

Considerando i risultati raccolti e i vantaggi derivanti dall'utilizzo delle membrane in questo tipo di applicazione, si ritiene che questa ricerca sia meritevole di ulteriori sviluppi che mirino al brevetto di uno specifico dispositivo per la purificazione di plasminogeno.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Sebag and E. A. Balazs, Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 30, n. 8 (1989) 1867–1871,.
- [2] Le Goff MM, Bishop PN, Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)* 22 (2008)1214-22.
- [3] P. Stalmans, M. S. Benz, M.D., A. Gandorfer, A. Kampik, A. Girach, S. Pakola, J. A. Haller, Enzymatic Vitreolysis with Ocriplasmin for Vitreomacular Traction and Macular Holes, *The New England Journal of medicine* 367 (2012) 606-615.
- [4] M. Hermel, W. Dailey, M. Trese, M. K. Hartzler, A disposable system for rapid purification of autologous plasmin as an adjunct to vitrectomy — performance and safety profile, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249 (2011) 37–46.
- [5] C. Azzolini, A. D'Angelo, G. Maestranzi, M. Codenotti, P. Della Valle, M. Prati, R. Brancato, Intravitreal Plasmin Enzyme in Diabetic Macular Edema, *American Journal of Ophthalmology* 138, n. 4 (2004) 560-567.
- [6] A. Gandorfer, “Enzymatic vitreous disruption,” *Eye*, vol. 22, n. 10 (2008) 1273–1277.

- [7] A. Uemura, M. Nakamura, S. Kachi, Y. Nishizawa, T. Asami, Y. Miyake, H. Terasaki, Effect of Plasmin on Laminin and Fibronectin During Plasmin-Assisted Vitrectomy, *Arch Ophthalmol* 123 (2005) 209-213.
- [8] A. Gandorfer, M. Ulbig, A. Kampik, Plasmin-assisted vitrectomy eliminates cortical vitreous remnants, *Eye* 16 (2002) 95–97.
- [9] Lopez-Lopez F, Rodriguez-Blanco M, Gómez-Ulla F, Marticorena J. Enzymatic vitreolysis. *Curr Diabetes Rev* 5 (2009) 57-62.
- [10] Sebag J. Pharmacologic vitreolysis premise and promise of the first decade. *Retina* 29 (2009) 871-4.
- [11] Rhéaume MA, Vavvas D. Pharmacologic vitreolysis. *Semin Ophthalmol* 25 (2010) 295-302.
- [12] Irena Tsui, Carolyn K. Pan, Ehsan Rahimy, and Steven D. Schwartz, Ocriplasmin for Vitreoretinal Diseases, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012).
- [13] T. C. Verstraeten, C. Chapman, M. Hartzler, B. S. Winkler, M. T. Trese, and G. A. Williams, Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit, *Archives of Ophthalmology*, vol. 111, n. 6 (1993) 849–854.
- [14] N. J.Kim,H.G. Yu, Y. S. Yu, andH. Chung, Long-term effect of plasmin on the vitreolysis in rabbit eyes, *Korean Journal of Ophthalmology*, vol. 18, n. 1 (2004) 35–40,.
- [15] A. Gandorfer, E. Putz, U. Welge-Luben, M. Gruterich, M. Ulbig, and A. Kampik, Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy, *British Journal of Ophthalmology*, vol. 85, n. 1 (2001) 6–10.

- [16] A. Gandorfer, S. Priglinger, K. Schebitz *et al.*, Vitreoretinal morphology of plasmin-treated human eyes, *American Journal of Ophthalmology*, vol. 133, n. 1 (2002) 156–159.
- [17] X. Li, X. Shi, and J. Fan, Posterior vitreous detachment with plasmin in the isolated human eye, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 240, n. 1 (2002) 56–62.
- [18] W. C.Wu, K. A. Drenser, M. T. Trese, G. A. Williams, and A. Capone, Pediatric traumatic macular hole: results of autologous plasmin enzyme-assisted vitrectomy, *American Journal of Ophthalmology*, vol. 144, n. 5, (2007) 668–672.
- [19] A. R. Margherio, R. R. Margherio, M. Hartzler, M. T. Trese, G. A. Williams, and P. J. Ferrone, Plasmin enzyme-assisted vitrectomy in traumatic pediatric macular holes, *Ophthalmology*, vol. 105, n. 9 (1998) 1617–1620.
- [20] M. T. Trese, G. A. Williams, and M. K. Hartzler, A new approach to stage 3 macular holes, *Ophthalmology*, vol. 107, n. 8 (2000) 1607–1611.
- [21] T. Sakuma, M. Tanaka, J. Inoue, A. Mizota, M. Souri, and A. Ichinose, Efficacy of autologous plasmin for idiopathic macular hole surgery, *European Journal of Ophthalmology*, vol. 15, n. 6 (2005) 787–794.
- [22] S. Rizzo, G. Pellegrini, F. Benocci, C. Belting, U. Baicchi, and M. Vispi, Autologous plasmin for pharmacologic vitreolysis prepared 1 hour before surgery, *Retina*, vol. 26, n. 7 (2006) 792–796.
- [23] T. Sakuma, M. Tanaka, J. Inoue, A. Mizota, M. Souri, and A. Ichinose, Use of autologous plasmin during vitrectomy for diabetic maculopathy, *European Journal of Ophthalmology*, vol. 16, n. 1 (2006) 138–140.

- [24] M. D. De Smet, C. Valmaggia , J. Zarranz-Ventura , B. Willekens, Microplasmin: ex vivo characterization of its activity in porcine vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50 (2009) 814-9.
- [25] A. Gandorfer , M. Rohleder, C. Sethi, et al. Posterior vitreous detachment induced by microplasmin, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (2004) 641-7.
- [26] A. Gandorfer, Microplasmin-assisted vitrectomy, *Dev Ophthalmol* 44 (2009) 26-30.
- [27] W. Chen, W. Mo, K. Sun, X. Huang, Y. L. Zhang, and H. Y. Song, Microplasmin degrades fibronectin and laminin at vitreoretinal interface and outer retina during enzymatic vitrectomy, *Current Eye Research*, vol. 34, n. 12 (2009) 1057–1064.
- [28] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principi di biochimica di Lehninger*, ZANICHELLI, V ED.
- [29] J. D. Henry, M. E. Prudich., W. Eykamp, T. A. Hatton, K. P., R. M. Johnston Lemert, R. Lemlich, J. C. G. Moyers Newman, H. A. Pohl., K. Pollock, M. P. Thien, Alternative separation processes, in R. H. Perry, D. W Green, J. O Maloney., *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, settima edizione, 1998, McGraw – Hill, Sidney, Australia.
- [30] R.K Scopes, *Protein Purification – Principles and Practice* 2nd edition, (1987) Springer.
- [31] J.R Whitaker, Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex, *Anal. Chem.* 35 (1963) 1950-1953.
- [32] P. Andrews, The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range, *Biochem. J.* 96 (1965) 595-606.

- [33] F. J. Castellino, J. R. Powell, Human Plasminogen, *Methods Enzymol*, 80 (1981) 365-378.
- [34] F. Axelsson Plasminogen, Product Monograph 1995, Version 1.1, Chromogenix AB, Mölndal, Sweden, 1995.
- [35] J. J. Hagan, F. B. Ablondi, E. C. De Renzo, Purification and Biochemical Properties of Human Plasminogen, 4 (1959) Vol. 235.
- [36] K. C. Robbins, L. Summaria. Purification of Human Plasminogen and Plasmin by Filtration on Sephadex and Chromatography on Diethylaminoethyl-Sephadex. 3 (1963) Vol. 238.
- [37] D. G. Deutsch, E. T. Mertz, Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography, *Science* 170 (1970) 1095-96.
- [38] B. Chibber, D. G. Deutsch., E. T. Mertz, Plasminogen, *Methods Enzymol* 34 (1974) 424-432.
- [39] L. Summaria, F. Spitz, L. Arzadon, I. G. Boreisha, K. C. Robbins Isolation and Characterization of the Affinity Chromatography Forms of Human Glu- and Lys-Plasminogens and Plasmins, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 251, No. 12 (1976) 3693-3699.
- [40] E. Sada, Engineering aspects of bioaffinity separation, *J. Chem. Eng. of Japan* 23 (1990) 259-269.
- [41] I. A. Chernova, K. Ya. Guriev., Structure and sorption characteristics of bioaffinity membranes, *J. Memb. Sci.* 113 (1996) 161-167.
- [42] A. Tejeda-Mansir, R. M. Montesino, R. Guzman, Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49 (2001) 1–28.

- [43] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 199–240.
- [44] S. Dimartino, C. Boi, G. C. Sarti, A validated model for the simulation of protein purification through affinity membrane chromatography, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 1677–1690.
- [45] Y. Planques, H. Pora, Affinity purification of plasminogen by radial-flow affinity chromatography, *Journal of Chromatography*, 539 (1991) 531-533.
- [46] G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. London, Academic Press (1992).
- [47] Drumheller, P. D., Hubbell, J. A. *The Biomedical Engineering Handbook Second Edition*, CRC Press (2000) Surface Immobilization of Adhesion Ligands for Investigations of Cell-Substrate Interactions.
- [48] M. Sorci, Membrane di affinità per la purificazione di biomolecole, Tesi di Dottorato Ciclo XVIII, Università di Bologna.
- [49] E. Klein, *Affinity membranes. Their chemistry and performance in adsorptive separation processes* (1991) John Wiley & Sons, Inc.
- [50] R. P. Zolton, E. T. Mertz, H. T. Russell, Assay of Human plasminogen in plasma by affinity chromatography, *Clinical Chemistry*, Vol. 18, n. 7 (1972).
- [51] E. Uchida, Y. Uyama, Y. Ikada', Sorption of Low-Molecular-Weight Anions into Thin Polycation Layers Grafted onto a Film, *Langmuir* 9 (1993) 1121-1124.
- [52] W. Albrecht, B. Seifert, T. Weigel, M. Schossig, A. Hollander, T. Groth, R. Hilke, Amination of Poly(ether imide) Membranes Using Di and Multivalent Amines, *Macromol. Chem. Phys.* 204 (2003), 510–521.

- [53] Manual Sartobind® Epoxy SheetA Separation Technology Based on Microporous Membranes Operating Instructions www.sartorius.com.
- [54] G. Houen Aminoalkyl affinity matrices, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 189–197.
- [55] I. T. Lazzarotto Bresolina, R. Rodrigues Fioritti, S. M. Alves Bueno, IgG purification by negative chromatography in amine-based ligands: A comparison of l-lysine and poly-l-lysine, *Process Biochemistry* 46 (2011), 2277–2285.
- [56] E. S. Winn, S. Hu, S. M. Hochschwender, R. A. Laursen. Studies on the lysine binding site of human plasminogen. *Eur. J. Biochem.* 104 (1980) 579-586.
- [57] P. G. Lerch, W. Lergier, D. Gillessen, E. E. Rickli. Localization of individual lysine binding regions in human plasminogen and investigations on their complex-forming properties. *Eur. J. Biochem.* 107 (1980) 7-13.
- [58] T. Younga, H. Chang, D. Linb, L. Cheng, Surface modification of microporous PVDF membranes for neuron culture, *Journal of Membrane Science* 350 (2010) 32–41.
- [59] M. T. Trese, G. A. Williams; M. Hartzler; W. A. Dailey, Kit for purification of plasmin, US Patent 618392 B1(2001).
- [60] R. Ghosh, T. Wong, Effect of module design on the efficiency of membrane chromatographic separation processes, *Journal of Membrane Science* 281(2006) 532–540.
- [61] R. Hahn, P. Bauerhansl, K. Shimahara, C. Wizniewski, A. Tscheliessnig, A. Jungbauer, Comparison of protein A affinity sorbents II. Mass transfer properties, *Journal of Chromatography A* 1093 (2005) 98–110.

- [62] F. H. Arnold, H. W. Blanch, C. R. Wilke, Analysis of affinity separations II: the characterization of affinity column by pulse techniques, *The Chemical Engineering Journal* 30 (1985) B25–B36.
- [63] S. Dimartino, Studio sperimentale e modellazione della separazione di proteine con membrane di affinità, Tesi di Dottorato Ciclo XXI, Università di Bologna.
- [64] GE Healthcare Instructions 71-7095-00 AE Affinity Media Sepharose www.gelifesciences.com.
- [65] Protein Purification Using Lysine HyperD® Chromatography Resin 4.2.8, www.pall.jp.
- [66] GE Healthcare Instructions 18-1134-79 AC Affinity Chromatography HiTrap Blue™ HP www.gelifesciences.com.
- [67] J. De Sousa Silva, Confronto tra supporti cromatografici di affinità per separazione di proteine, Tesi di dottorato Ciclo XXV, Università di Bologna.
- [68] A. Malavasi, Comparison between two different chromatographic technologies, Tesi di Laurea A.A 2008-2009, Università di Bologna.

APPENDICE

A.1 Composizione delle soluzioni utilizzate nelle prove

A.1.1 Modifica delle membrane

Protocollo I

Di seguito sono riportate le quantità riferite alla modifica di 6 membrane:

1. Tampone di reazione

Soluzione 1:

- 0.476 g di $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (10 H_2O) sciolti in 50 mL di H_2O demineralizzata;
- Raggiungere il pH = 10 con 0.1 M NaOH
- Aggiungere 0.5 M di L-lisina
- Filtrare la Soluzione 1 con filtri da 0.45 μm .

Unire 50 mL di 1,4-diossano alla Soluzione 1.

2. Soluzioni per il lavaggio

- 25 mL di isopropanolo
- 25 mL di esano

Protocollo II

Di seguito sono riportate le quantità riferite alla modifica di 6 membrane:

1. Tampone di reazione:

- 100 mL di 100 mM di tampone fosfato a pH = 8 filtrato
- Aggiungere 2.5 M di L-lisina

2. 100 mM di tampone fosfato:

Soluzione A:

- 1.38 g di NaH_2PO_4 (H_2O)
- 100 mL di H_2O demineralizzata

Soluzione B:

- 7.1 g di Na_2HPO_4
- 500 mL di H_2O demineralizzata

Aggiungere la soluzione A alla soluzione B fino a raggiungere il pH = 8 e filtrare con filtri da 0.45 μm .

3. Tampone di incubazione:

- 1 M di etanolamina in 100 mM di tampone fosfato a pH = 8 filtrato.
- Raggiungere il pH = 9.5 con 1 M di HCl

4. Lavaggio

- 1 volta con 20 mL di 100 mM di tampone fosfato filtrato per 5 minuti
- 4 volte con 20 mL di 1 M di NaCl in H_2O filtrata per 5 minuti
- 1 volta con 20 mL di 100 mM di tampone fosfato.

A.1.2 Caratterizzazione dinamica delle membrane

Protocollo I

50 mM tampone fosfato, 300 mM NaCl a pH = 7.5:

Soluzione A:

- 6.9 g di NaH_2PO_4 (H_2O)
- 17.53 g di NaCl
- 800 mL di H_2O
- Portare a volume di 1000 mL con H_2O demineralizzata

Soluzione B:

- 7.1 g di Na_2HPO_4
- 17.53 g di NaCl
- 800 mL di H_2O
- Portare a volume di 1000 mL con H_2O demineralizzata

Aggiungere la soluzione A alla soluzione B fino a raggiungere il pH = 7.5 e filtrare con filtri da 0.45 μm .

0.2 M acido amminocaproico:

- 2.6 g di acido amminocaproico
- 100 mL di H_2O filtrata

Protocollo II

100 mM di tampone fosfato pH = 8 (Rif. A1.1)

15 mM acido amminocaproico:

- 0.1965 g in 100 mL di tampone fosfato

A.1. 3 Prove cromatografiche con resina

1. Resina HyperD Pall

Stesse soluzioni indicate per la caratterizzazione dinamica delle membrane modificate con il Protocollo I (Rif. A.1.2).

2. Resina Hitrap Blue

0.1 M Tris-HCl pH 8.0 :

- 12.2 g Tris Base fino a pH 8.0 con 1 M HCl

Portare a volume di 1000 mL con H₂O demineralizzata e filtrare con filtri da 0.45 µm.

0.05 M KH₂PO₄ contenente 1.5 M KCl a pH 7.0

- 6.8 g di KH₂PO₄
- 11.83 g di KCl
- Sciogliere in 1000 mL di H₂O demineralizzata

Portare a pH 7.0 con 1 M NaOH e filtrare con filtri da 0.45 µm.

A.1. 4 Analisi HPLC

Soluzione SEC:

Soluzione A: 0.1 M tampone fosfato monobasico, 300 mM NaCl

- 13.8 g di NaH₂PO₄ (H₂O)

- 17.53 g di NaCl

Sciogliere i componenti in 1000 mL di H₂O Milli-Q.

Soluzione B: 0.1 M tampone fosfato dibasico, 300 mM NaCl

- 14.2 g di Na₂PO₄
- 17.53 g di NaCl

Sciogliere i componenti in 1000 mL di acqua Milli-Q.

Aggiungere la Soluzione A alla Soluzione B fino a raggiungere il pH 6.7.

Sciogliere 0.5 g di NaN₃ in 1000 mL di soluzione per la SEC. Filtrare attraverso filtri da 0.22 µm.

A.1.5 Elettroforesi

1. Running Buffer (5X)

Dosi per 2 litri:

- 144 g di glicina
- 30 g Tris Base
- 10 g SDS

Portare a volume con acqua demineralizzata.

2. CPB (5X)

- 5 mL glicerolo
- 1 g SDS
- 2.31 mL *Tris HCl pH 6.8*
- tracce blu di bromofenolo

Filtrare la soluzione con un filtro a siringa da 0.45 µm

Condizioni di stoccaggio: congelare la soluzione in microprovette (372 μ L in ciascuna)

Condizioni di utilizzo: portare il contenuto della singola microprovetta a 500 L, aggiungendo 128 mL di β -mercapto-etanolo.

3. Tris HCl a pH 6.8

Dosi per 100 mL:

- 40 mL di acqua demineralizzata
- 6.5 g di Tris base
- 0.4 g SDS

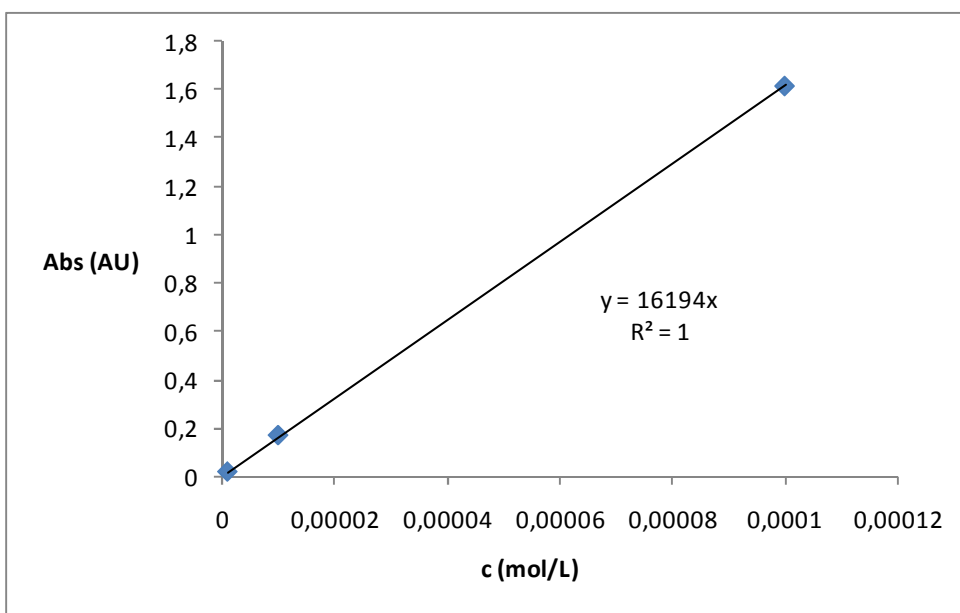
Portare a pH=6.8 con HCl 1 N.

Portare a volume con acqua demineralizzata.

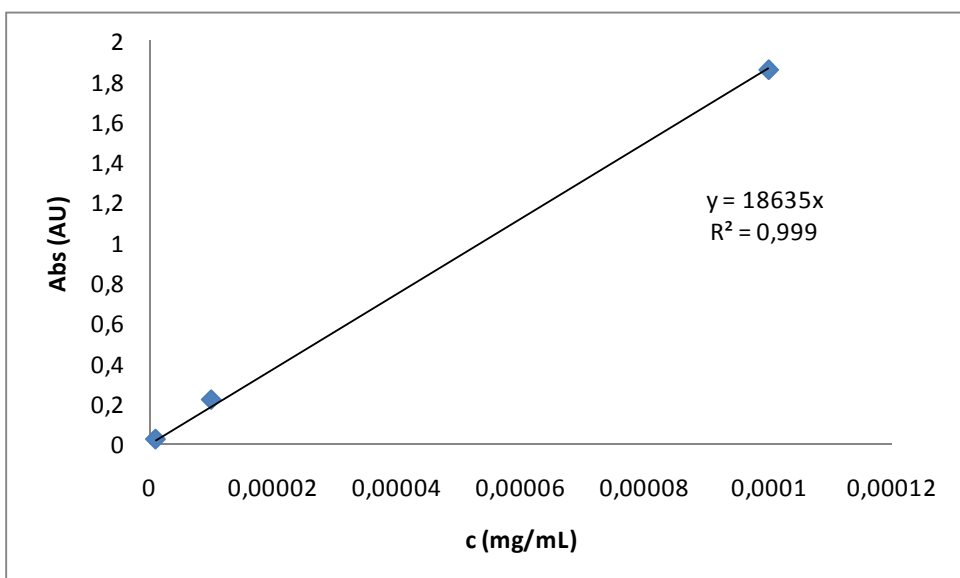
A.2 Retta di calibrazione dello spettrofotometro con acido arancio 7

L'assorbanza di soluzioni a diverse concentrazioni di acido arancio 7 in 10^{-3} M di NaOH è stata letta, con lo spettrofotometro Shimadzu, in corrispondenza della lunghezza d'onda di 485 nm, utilizzando due diverse cuvette in quarzo.

- Calibrazione con cuvette in quarzo da 1mL.



- Calibrazione con cuvette in quarzo da 0.7 mL.



A.3 Modulo a membrane

Il modulo, costruito in acciaio inox, si divide in due parti principali: un maschio ed una femmina, le cui dimensioni sono riportate in Tabella A1, su cui sono posizionati i collettori di flusso per favorire la distribuzione del fluido sull'intera area del modulo (Figura A1).

Tabella A1 Dimensioni del modulo.

Diametro (mm)	Altezza gola femmina (mm)	Altezza maschio (mm)
26	25.4	24.8

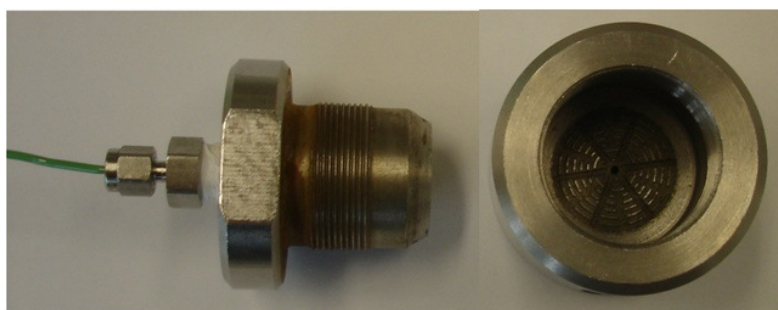


Figura A1 Elementi costitutivi del modulo: maschio (a sinistra) e femmina (a destra).

In direzione dei collettori vengono posizionati dei dischi (frits) in teflon-peek che migliorano ancor più la distribuzione del fluido in ingresso ed in uscita (Figura A2). Due o-ring inseriti tra i frits e il modulo consentono la tenuta stagna della dell'intero sistema.



Figura A2 Frits in teflon-peek.

La compressione ottimale delle membrane si raggiunge con l'ausilio di uno o più anelli in acciaio, come quello rappresentato in Figura A3, che, inseriti tra il maschio e la femmina, fungono da distanziali.



Figura A3 Distanziale.

La compressione percentuale delle membrane all'interno del modulo viene calcolata secondo la relazione:

$$P_{100} = (L_{\text{memb}} - L_{\text{reale}}) * 100 / L_{\text{memb}}$$

In cui L_{memb} corrisponde allo spessore nominale totale del pacchetto di membrane inserito ed L_{reale} rappresenta lo spessore disponibile per l'inserimento delle membrane nel modulo.

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento va rivolto ai Dirigenti Medici della clinica di oculistica dell'Arcispedale di Reggio Emilia, Dott. Zotti e Dott. Cappuccini che manifestando l'esigenza di disporre di un processo rapido ed economico per la purificazione del plasminogeno hanno contribuito all'avvio dell'attività di ricerca descritta nella presente Tesi di Dottorato.